

Aus dem Zentrum Anatomie der Universität zu Köln  
Institut I für Anatomie  
Geschäftsführender Direktor: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. M. Scaal

**Verbesserte Erholung der Vibrissenbewegungen  
durch Therapie mit Injektionen von neurotrophen  
Faktoren in die Schnurrhaarmuskulatur nach  
chirurgischer Rekonstruktion des Gesichtsnerven  
bei Ratten**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Christina Hadjiparaskeva  
aus Larnaka, Zypern

promoviert am 27. November 2023



Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Professor Dr. med. D. N. Angelov
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. D. Fischer

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung der Quellen sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Operationen an den Versuchstieren wurden von Frau Prof. Dr. med. Maria Grosheva und Frau Priv.-Doz. Dr. med. dent. Svenja Rink-Notzon durchgeführt.

Die täglichen postoperativen Injektionen von neurotrophen Faktoren bzw. neutralisierenden Antikörpern, die transkardiale Perfusion und Fixierung der Tiere und das Herauspräparieren der zu untersuchenden Muskeln wurden von Herrn Prof. Dr. med. Doychin N. Angelov durchgeführt.

Die Entfernung der für das Experiment nicht benötigten Vibrissen sowie die Videoaufnahmen von den Versuchstieren während der aktiven Exploration wurden im Team mit Frau Priv.-Doz. Dr. med. dent. Svenja Rink-Notzon, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Habib Bendella, Frau Luisa Elles (M.Sc.) und mir selbst unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Doychin N. Angelov durchgeführt.

Die videobasierte Bewegungsanalyse mit der Software *Peak Motus 2000* (Peak Performance Technologies, Inc., USA) wurde nach entsprechender Anleitung durch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Habib Bendella von mir selbst durchgeführt.

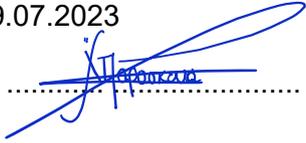
Die Gewebeaufbereitung, immun- und histochemische Färbung sowie Fluoreszenzmikroskopie wurden von der technischen Assistentin Frau Luisa Elles (M.Sc.) durchgeführt.

Die statistische Evaluation wurde von Herrn Prof. Dr. Levent Sarikcioğlu durchgeführt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 09.07.2023

Unterschrift:  .....

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen an diesem Projekt beteiligten Personen herzlich bedanken, ohne deren Unterstützung die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Doychin N. Angelov meinen besonderen Dank für die Betreuung dieser Arbeit ausrichten. Ihm verdanke ich die Einführung und die Beteiligung in ein derart spannendes Forschungsfeld. Seine sorgfältigen Korrekturvorschläge und sein konstruktives Feedback ermöglichten mir die kritische Auseinandersetzung mit dem Thema.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Zweitgutachter Herrn Universitätsprofessor Dr. rer. nat. D. Fischer bedanken für das sorgfältige Lesen und Korrigieren meiner Arbeit.

Meinen großen Dank drücke ich ebenfalls allen Mitgliedern unseres Arbeitskreises aus, Frau Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Svenja Rink-Notzon, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Habib Bendella, Frau Luisa Elles (M.Sc.), Frau Prof. Dr. med. Maria Grosheva und Herrn Prof. Dr. Levent Sarikcioğlu. Ohne ihre Mitarbeit wäre die Durchführung der Experimente und Auswertung der Ergebnisse nicht zustande gekommen. An dieser Stelle möchte ich mich insbesondere bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Habib Bendella bedanken, der mir die notwendigen Kenntnisse für die Nutzung der Software zur videobasierten Bewegungsanalyse sehr ausführlich und mit viel Geduld vermittelte.

Mein herzlichster Dank geht an meine Familie und insbesondere an meine Eltern Kyriacos und Elena Hadjiparaskeva, die mir das Studium der Humanmedizin in Deutschland ermöglicht und von Anfang an bei jedem Schritt und jeder Schwierigkeit Beistand geleistet haben. Sehr dankbar bin ich auch meiner Schwester, Nicoleta Hadjiparaskeva, für ihre große Unterstützung, die langen Gespräche und die immer wieder nötige Ablenkung.

Zu guter Letzt möchte ich mich herzlich bei meinem Partner Sven Sudmann bedanken, der mir stets zur Seite stand. Unsere langen Gespräche und kritischen Diskussionen regen mich immer zum Denken an und bringen mich einen Schritt voran.

Für meine Familie und Sven

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>9</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>10</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>12</b>
2.1. Klinische Relevanz des <i>N. facialis</i> und der peripheren Fazialisparese	12
2.2. Anatomische Grundlagen und Verlauf des <i>N. facialis</i> beim Menschen	14
2.3. Anatomische Grundlagen bei der Ratte	15
2.3.1. Die Schnurrhaarregion der Ratte	15
2.3.2. Muskelbeteiligung bei der aktiven Exploration	17
2.3.3. Innervation der Schnurrhaarmuskeln und makroskopische Anatomie des extratemporalen <i>N. facialis</i>	17
2.3.4. Vorteile der Untersuchungen am Modell des <i>N. facialis</i>	17
2.4. Neuroanatomische Grundlagen	19
2.4.1. Der Aufbau eines peripheren Nerven	19
2.4.2. Das Motoneuron	20
2.4.3. Anatomische und physiologische Grundlagen der neuromuskulären Endplatte	20
2.5. Schwann-Zellen	22
2.6. Postläsionale Abläufe in peripheren Nerven	24
2.6.1. Häufig untersuchte Läsionsarten peripherer Nerven	24
2.6.2. Abläufe im distalen Stumpf	24
2.6.3. Abläufe am Ort der Läsion	25
2.6.4. Abläufe im Bereich der neuromuskulären Endplatte	26
2.7. Gründe für unzureichende Funktionswiederherstellung nach einer Nervenläsion	29
2.8. Neurotrophe Faktoren	32
2.8.1. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	33
2.8.2. Fibroblast growth factor 2 (FGF-2)	34
2.9. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	35
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>38</b>
3.1. Tiere	38

3.2.	Operation (BBA – Buccalis-Buccalis-Anastomose)	38
3.3.	Postoperative Injektionen von BDNF, FGF-2 und anti-BDNF	38
3.4.	Videobasierte Bewegungsanalyse (VBMA) der Vibrissen während aktiver Exploration	40
3.5.	Gewebeaufbereitung für die neuromuskuläre Immunzytochemie	43
3.5.1.	Immunozytochemisches Protokoll	43
3.5.2.	Fluoreszenzmikroskopie und Beurteilung der NMJs	44
3.6.	Statistische Evaluation	46
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
4.1.	Quantitative Auswertung der Ergebnisse der videobasierten Bewegungsanalyse der Vibrissen präoperativ und nach postoperativer Behandlung mit neurotrophen Faktoren	47
4.1.1.	Präoperative Leistungsfähigkeit der Vibrissen in intakten Ratten	47
4.1.2.	Leistungsfähigkeit der Vibrissen am 28. postoperativen Tag: Kein signifikanter Effekt der Behandlung mit neurotrophen Faktoren	47
4.1.3.	Leistungsfähigkeit der Vibrissen am 56. postoperativen Tag: Signifikante Verbesserung der Whisking-Amplitude durch Gabe von anti-BDNF, FGF-2 oder deren Kombination	47
4.1.4.	Vergleich der Leistungsfähigkeit der Vibrissen zwischen dem 28. und 56. Tag: Signifikante Besserung der Whisking-Amplitude durch Gabe von BDNF und FGF-2 allein oder in Kombination mit anti-BDNF	48
4.2.	Auswertung der Qualität der Reinnervation	48
4.3.	Verhältnis zwischen der Whisking-Amplitude und dem prozentualen Anteil an nicht-innervierten NMJs	49
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>55</b>
5.1.	Rolle der neurotrophen Faktoren für die Reinnervation und Funktionswiederherstellung der Vibrissen	56
5.1.1.	BDNF	56
5.1.2.	FGF-2	57
5.2.	Rolle des Reinnervationsmusters an mangelhafter Funktionswiederherstellung der Vibrissen	58
5.3.	Limitationen der Studie	59
5.4.	Fazit und Zukunftsaussichten	60

<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>62</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>74</b>
7.1.	Abbildungsverzeichnis	74
7.2.	Tabellenverzeichnis	77
<b>8.</b>	<b>VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN</b>	<b>78</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ANOVA – Analysis of variance, *engl.* für Varianzanalyse

BBA – Buccalis-Buccalis-Anastomose

BDNF – Brain-derived neurotrophic factor

bSC – Bridge Schwann cell, *engl.* für Brücken-Schwann-Zelle

FGF-2 – Fibroblast growth factor 2

M. – Musculus

mSC – Myelinisierende Schwann-Zelle

N. – Nervus

NF – Neurotropher Faktor

NMJ – Neuromuscular junction, *engl.* für neuromuskuläre Endplatte

PBS – Phosphate-buffered saline, *engl.* für phosphatgepufferte Salzlösung

PNS – Peripheres Nervensystem

R. – Ramus

rSC – Repair Schwann cell, *engl.* für Reparatur-Schwann-Zelle

SC – Schwann cell, *engl.* für Schwann-Zelle

SD – Sprague-Dawley

SD/RCS – Sprague-Dawley/Royal College of Surgeons

tSC – Terminal Schwann cell, *engl.* für terminale Schwann-Zelle

VBMA – Video-based motion analysis, *engl.* für videobasierte Bewegungsanalyse

ZNS – Zentrales Nervensystem

## 1. Zusammenfassung

Die periphere Fazialisparese schränkt den Alltag der Betroffenen stark ein, da sowohl physiologische Grundfunktionen – wie Sehen und Essen – als auch die zwischenmenschliche Kommunikation (Sprechen, Mimik) beeinträchtigt werden. Eine Ursache für die Fazialisparese stellt die Durchtrennung des *Nervus facialis* (Gesichtsnerv) dar, die unter anderem iatrogen oder traumatisch bedingt sein kann. Nach einer solchen Durchtrennung dauert die Funktionswiederherstellung der (von dem Gesichtsnerv versorgten) Muskeln teilweise sehr lange und bleibt trotz aller bisher bekannten therapeutischen Maßnahmen häufig unzureichend. Aus diesem Grund ist die genauere Untersuchung der Nervenregeneration und deren Einflussfaktoren essenziell. Dabei rücken in den letzten Jahrzehnten die neurotrophen Faktoren (NFs) immer mehr in den Fokus der Forschung, da sie unter anderem das Überleben und die Regeneration der durchtrennten Axone fördern.

Die vorliegende Arbeit basiert auf früheren Experimenten unseres Arbeitskreises, die die Wiederherstellung der Vibrissenfunktion nach chirurgischer Fazialisdurchtrennung und -reanastomosierung zwischen blinden und normalsichtigen Ratten verglichen. Beurteilt wurde in diesen Studien außerdem das Reinnervationsmuster und die intramuskuläre Proteinmenge von NFs. Dabei stellte sich heraus, dass die blinden – im Gegensatz zu den normalsichtigen – Ratten eine perfekte Wiederherstellung der motorischen Vibrissenfunktion zeigten. Bei den blinden Ratten konnte außerdem ein deutlich geringerer Anteil an polyinnervierten neuromuskulären Endplatten (NMJs; *engl. neuromuscular junction*) beobachtet werden. Auch die Menge bzw. die Dynamik der verschiedenen NF-Proteine war bei den blinden Ratten unterschiedlich. Die Menge an FGF-2-Protein (*fibroblast growth factor 2*) war bereits präoperativ höher im Vergleich zu den normalsichtigen Ratten und blieb bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nahezu konstant. Bei den normalsichtigen Ratten kam es im Gegensatz dazu erst nach dem zweiten postoperativen Tag zu einem Anstieg des FGF-2-Proteins, durch den sich die Unterschiede zwischen den Gruppen ausglich. Die BDNF-Proteinmenge (*brain-derived neurotrophic factor*) wies dagegen einen späten Anstieg ab dem 14. Tag auf, der erst am 28. Tag signifikant wurde. Dieser blieb bei den normalsichtigen Ratten aus.

Angelehnt an diese Beobachtungen untersuchten wir nach chirurgischer Durchtrennung und -reanastomosierung eines Fazialisastes (*Ramus buccalis*) den therapeutischen Effekt einer intramuskulären, exogenen Gabe von NFs oder deren neutralisierenden Antikörpern auf das Reinnervationsmuster und die Vibrissenfunktion. Die Therapiedauer betrug dabei 28 Tage und die insgesamt Untersuchungsdauer 56 Tage. Wir unterteilten sechzig normalsichtige Ratten in zehn Gruppen und injizierten diese zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit verschiedenen Kombinationen und Dosierungen von NFs, deren neutralisierenden Antikörpern oder einer Placebolösung. Am 28. und 56. Tag wurden die Ratten bei der aktiven Exploration mit

einer Videokamera aufgenommen und am 56. Tag erfolgten die Tiefnarkose und transkardiale Perfusion der Tiere zum Herauspräparieren des zu untersuchenden Muskels (*Musculus [M.] nasolabialis*) in der Schnurrhaarregion. Anschließend erfolgte die Bewegungsanalyse der Videoaufnahmen für die Beurteilung der Vibrissenfunktion sowie die Fluoreszenzfärbung von longitudinalen Kryostatschnitten des *M. nasolabialis* für die Beurteilung des Reinnervationsmusters.

Eine verbesserte Vibrissenfunktion zeigte sich bei der Gabe von anti-BDNF und FGF-2, entweder als jeweils alleinige Substanz oder in Kombination miteinander. FGF-2, allein oder in Kombination mit anti-BDNF, führte außerdem zu einer perfekten Reinnervation, d. h. es wurden keine nicht-innervierten NMJs beobachtet. Es fiel jedoch auf, dass der Anteil polyinnervierter NMJs nicht signifikant geringer – im Vergleich zu der Placebogruppe – war. Im Gegensatz dazu hatten die Gruppen, die eine signifikante Abnahme der Polyinnervation zeigten, keine signifikant bessere Vibrissenfunktion. Das könnte jedoch auch möglicherweise damit zusammenhängen, dass diese Gruppen gleichzeitig einen höheren Anteil an nicht-innervierten NMJs aufwiesen.

Unseren Ergebnissen zufolge lässt sich daher darauf schließen, dass eine komplexe, zeitlich abgestimmte Therapie mit NFs oder deren neutralisierenden Antikörpern – in diesem Fall anti-BDNF und FGF-2 – die Vibrissenfunktion positiv beeinflussen kann. Das Reinnervationsmuster scheint dagegen eine geringere Rolle zu spielen als ihm bisher zugeschrieben wurde. Zukünftige Studien sollten daher Aufschluss sowohl über die Bedeutung des Reinnervationsmusters als auch über die genauen Dosierungen, Kombinationen und Zeitpunkte der Verabreichung von NFs geben.

## 2. Einleitung

### 2.1. Klinische Relevanz des *N. facialis* und der peripheren Fazialisparese

Der *Nervus (N.) facialis* ist beim Menschen der siebte Hirnnerv, der – unter anderem – als alleiniger Nerv für die Innervation der mimischen Gesichtsmuskulatur zuständig ist. Diese umfasst die Muskulatur des Schädeldachs, der Lidspalte, der Nase, des Mundes, des Ohrs und des Hautmuskels des Halses und erfüllt ein großes Spektrum an Aufgaben. Dazu gehören beispielsweise der Augenschluss und Mundschluss, das Stirn- und Augenbrauenrunzeln sowie das Lächeln und weitere Gesichtsausdrücke. Einerseits erfüllt somit die mimische Muskulatur essenzielle Aufgaben wie der Schutz des Auges vor Fremdkörpern durch den Lidschluss oder die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme durch den Mundschluss beim Schlucken. Andererseits ist sie unentbehrlich für die soziale Interaktion und zwischenmenschliche Kommunikation, da durch die Kontraktion der einzelnen Muskeln Emotionen sichtbar gemacht werden können.<sup>1</sup>

Eine periphere Läsion des *N. facialis* – die sogenannte periphere Fazialisparese – tritt am häufigsten idiopathisch auf. Im angloamerikanischen Raum wird diese idiopathische Form häufig als *Bell's palsy* bezeichnet und ist mit einer sehr guten Prognose assoziiert. Im Gegensatz dazu haben weitere Formen der peripheren Fazialisparese – wie beispielsweise iatrogene Läsionen im Rahmen von Operationen oder traumatische Frakturen des Schläfenbeins (*Os temporale*) – oft eine schlechtere Prognose.<sup>2,3</sup>

Die periphere Fazialisparese hat schwerwiegende Folgen für die Betroffenen. Die verlängerte Exposition der Hornhaut bei beeinträchtigtem Lidschluss führt beispielsweise zu erhöhtem Risiko, die sogenannte Expositionskeratitis mit Ulzerationen und Entzündungen der Hornhaut bis hin zur Blindheit zu entwickeln.<sup>4</sup> Außerdem führt der mangelnde Mundschluss zu Schwierigkeiten beim Sprechen und Essen.<sup>5,6</sup>

Des Weiteren bereitet Betroffenen der eingeschränkte Ausdruck von Emotionen – als Folge des Ausfalls der mimischen Muskulatur – Schwierigkeiten im sozialen und Kommunikationsbereich. Viele Patient\*innen nehmen ihre eigene Fähigkeit, bestimmte Emotionen auszudrücken, als eingeschränkt wahr.<sup>7</sup> ISHII ET AL. (2011) haben Probanden Bilder von Menschen mit chronischer Fazialisparese sowie von gesunden Menschen (Kontrollen) vorgelegt; dabei mussten die Probanden die jeweiligen Gesichtsausdrücke (sowohl in Ruhestellung des Gesichts, als auch beim Lächeln) als positiv, negativ oder neutral einstufen. Es stellte sich heraus, dass der Gesichtsausdruck von Menschen mit chronischer Fazialisparese in den meisten Fällen von den Probanden als negativ empfunden wurde, selbst wenn sie in den Bildern gelächelt haben. Im Gegensatz dazu nahmen die Probanden die Gesichter der Kontrollen in Ruhestellung in den meisten Fällen als neutral oder positiv wahr, und beim Lächeln nahezu immer

positiv.<sup>8</sup> In einer weiteren Studie haben ISHII ET AL. (2012) zudem gezeigt, dass Gesichter von Menschen mit Fazialisparese als weniger attraktiv wahrgenommen werden.<sup>9</sup>

In den Folgemonaten nach einer Läsion des *N. facialis* entwickelt sich oft ein weiteres, für die Patient\*innen sehr beeinträchtigendes Symptom, die sogenannte Synkinese.<sup>10,11</sup> Dabei handelt es sich um die unwillkürliche Mitaktivierung eines Muskels (oder Muskelgruppe) während der willkürlichen Kontraktion eines anderen Muskels bzw. Muskelgruppe. Ein häufig beobachtetes Muster ist beispielsweise die sogenannte okulo-orale Synkinese (*engl. ocular-oral synkinesis*); bei dieser wird gleichzeitig zum willkürlichen Augenschluss der Mundwinkel unwillkürlich mitbewegt. Umgekehrt wird bei der oral-okularen Synkinese (*engl. oral-ocular synkinesis*) gleichzeitig zu einer willkürlichen Mundbewegung (z. B. Lächeln) eine unwillkürliche Augenbewegung (z. B. Verschmälerung der Lidspaltenweite oder sogar Augenschluss) ausgeführt. Es gibt mehrere Erklärungsansätze für die Entstehung der Synkinese; im Folgenden werden die drei Verbreitetsten aufgeführt. Am häufigsten wird die fehlerhafte Reinnervation nach einer Nervenläsion als Hauptursache angenommen.<sup>12–14</sup> Trotz früher chirurgischer Intervention ist es bis heute noch nicht gelungen, durchschlagende Erfolge in der Wiederherstellung der ursprünglichen Nervenfunktion nach einer peripheren Nervenläsion zu erzielen. Hintergrund hierfür ist, dass während der Regenerationsphase mehrere Kollateralen (bis zu 25) aus jedem durchtrennten Axon entspringen, was ein sehr ungezieltes axonales Wachstum in durchtrennten peripheren Nerven zur Folge hat (s. Abschnitt 2.7).<sup>15,16</sup> Im Fall der okulo-oralen Synkinese kommt es beispielsweise dazu, dass aus regenerierenden Axonen, die eigentlich nur den Mundringmuskel (*Musculus [M.] orbicularis oris*) reinnervieren sollten, Kollateralen entspringen, die fälschlicherweise zusätzlich den Augenringmuskel (*M. orbicularis oculi*) reinnervieren. Somit kommt es zu einer gleichzeitigen Kontraktion der beiden Muskeln, die sich klinisch als Synkinese präsentiert.<sup>12–14</sup>

Eine weitere Hypothese schreibt synkinetische Bewegungen der sogenannten ephaptischen Übertragung (*engl. ephaptic transmission*) zwischen remyelinisierten Axonen zu. Bei einem größtenteils degenerierten Nerv kommt es zu einer unzureichenden Remyelinisierung der Axone durch die Schwann-Zellen. Die daraus resultierende mangelhafte Isolierung der Axone führt infolgedessen zur Kreuzerregung (*engl. cross-excitation*) von benachbarten Axonen, die unterschiedliche Muskeln bzw. Muskelgruppen innervieren. Eine Übererregbarkeit des Fazialiskerns durch den Ausfall von afferenten inhibitorischen Signalen nach einer Läsion wird ebenfalls als ein möglicher Mechanismus für die Entstehung von Synkinese angenommen. Synkinetische Bewegungen können sehr dezent sein und von den Betroffenen (und ihrem Umfeld) sogar ignoriert werden; es gibt jedoch auch Fälle, bei denen die Synkinese dermaßen ausgeprägt ist, dass es zu starken Schmerzen – durch die gleichzeitige Aktivierung von mehreren Muskelgruppen – sowie zur Beeinträchtigung von sozialen Interaktionen kommt.<sup>12–14</sup>

Eine Weiterentwicklung und Optimierung der derzeit verfügbaren sowie die Einführung neuer Therapiemöglichkeiten der peripheren Fazialisparese ist dementsprechend von großer Bedeutung, weil die Lebensqualität der Betroffenen hiermit deutlich verbessert werden könnte.

## **2.2. Anatomische Grundlagen und Verlauf des *N. facialis* beim Menschen**

Der *N. facialis* des Menschen besteht aus Axonen unterschiedlicher Qualitäten, die drei Kerngebieten im Hirnstamm zugeordnet werden. In seinem Hauptkern, dem *Nucleus n. facialis*, haben speziell viszeroefferente Axone ihren Ursprung, die die mimische Muskulatur, Teile der suprahyoidalen Muskulatur (*M. stylohyoideus* und *Venter posterior* des *M. digastricus*) sowie den *M. stapedius* des Mittelohrs versorgen. Aus dem *Nucleus salivatorius superior* stammen viszeroefferente, parasympathische präganglionäre Fasern, durch deren Umschaltung schließlich die Tränendrüse (*Glandula lacrimalis*), die Unterkiefer- (*Glandula submandibularis*) und Unterzungenspeicheldrüse (*Glandula sublingualis*) sowie kleinere Drüsen der Nasenschleimhaut, des Gaumens und des Zungenrückens versorgt werden. Im *Nucleus tractus solitarii* enden speziell viszeroeffere zentrale Axone. Diese entstammen pseudounipolaren Neuronen, deren Zellkörper sich im *Ganglion geniculi* befinden. Die peripheren Fortsätze dieser Neuronen dienen als Geschmacksfasern der vorderen zwei Drittel der Zunge.<sup>1</sup>

Die Axone aus dem *Nucleus salivatorius superior* und *Nucleus tractus solitarii* verlassen im Kleinhirnbrückenwinkel als sogenannter *N. intermedius* den kaudalen *Pons* und lagern sich den Axonen aus dem *Nucleus n. facialis* an, wodurch der *N. facialis* gebildet wird.<sup>1</sup>

Der *N. facialis* zieht nach seinem Austritt aus dem *Pons* durch den *Porus acusticus internus* in das Felsenbein (*Pars petrosa* des *Os temporale*), wo er sich im Anschluss in seine Äste aufspaltet. Der erste Ast wird als *N. petrosus major* bezeichnet und enthält viszeroefferente, parasympathische präganglionäre Axone aus dem *Nucleus salivatorius superior*, die im *Ganglion pterygopalatinum* umgeschaltet werden. Die postganglionären Axone versorgen schließlich die Tränendrüse sowie kleine Drüsen der Nasenschleimhaut. Der *N. stapedius* stellt den zweiten Ast dar, der zum gleichnamigen Muskel im Mittelohr zieht.<sup>1</sup>

Die nächste Abzweigung wird als *Chorda tympani* bezeichnet. In dieser verlaufen sowohl die speziell viszeroeffere Geschmacksfasern aus den vorderen zwei Dritteln der Zunge, die im *Nucleus tractus solitarii* enden, als auch die viszeroeffere, parasympathischen präganglionären Axone, die dem *Nucleus salivatorius superior* entstammen. Letztere werden im *Ganglion submandibulare* umgeschaltet und die postganglionären *Rami (Rr.) glandulares* versorgen schließlich die *Glandula submandibularis*, *Glandula sublingualis* sowie kleinere Speicheldrüsen der vorderen zwei Drittel der Zunge.<sup>1</sup>

Die speziell viszeroeffferenten Axone, die die mimische Muskulatur versorgen, verlaufen durch das Felsenbein und verlassen dieses durch das *Foramen stylomastoideum*. Nach ihrem Austritt aus Letzterem kommt es zu einer weiteren Verzweigung. Der erste Zweig wird als *N. auricularis posterior* bezeichnet und versorgt u. a. die hinteren Ohrmuskeln. Die übrigen speziell viszeroeffferenten Axone bilden in der Speicheldrüse den sogenannten *Plexus intraparotideus*. Zu diesem gehören mehrere Äste, die für die Versorgung der ipsilateralen mimischen Muskulatur zuständig sind. Dazu gehören die *Rr. temporales*, *Rr. zygomatici*, *Rr. buccales* und der *Ramus (R.) marginalis mandibulae*. Auch kleinere Äste wie der *R. digastricus* und *R. stylohyoideus*, die Teile der suprahyoidalen Muskulatur versorgen, sowie der am weitesten kaudal liegende *R. colli* entstammen dem *Plexus intraparotideus*.<sup>1</sup>

## **2.3. Anatomische Grundlagen bei der Ratte**

### **2.3.1. Die Schnurrhaarregion der Ratte**

Die Schnurrhaarregion der Ratte (*engl. mystacial pad* oder *whisker pad*) umfasst die insgesamt ca. 35 große Schnurrhaare (Vibrissen, *lat. Vibrissae*) der jeweiligen Gesichtshälfte sowie die verschiedenen Muskeln, die die Bewegung dieser ermöglichen.<sup>17</sup> Diese Region ist unentbehrlich für das Überleben des Tieres, da durch die rhythmische Bewegung der Schnurrhaare die Erkundung der Umgebung und somit der Informationsgewinn über den *N. trigeminus* (*N. maxillaris*) erfolgt.<sup>18,19</sup>

Die Schnurrhaare sind organisiert in fünf waagerechten Reihen (A, B, C, D und E) und eine – sich kaudal davon befindliche – senkrechte Reihe. Die waagerechten Reihen A und B umfassen üblicherweise jeweils vier Schnurrhaarfollikeln; die Reihen C, D und E verfügen über jeweils ca. sieben Follikeln. In der senkrechten Reihe befinden sich ebenfalls vier Follikel, die mit den Buchstaben  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  gekennzeichnet werden; diese Schnurrhaare sind besonders groß im Vergleich zum Rest (s. Abbildung 1).<sup>17,20</sup>

Die Muskeln, die sich in der Schnurrhaarregion befinden und für die Pro- (Bewegung nach rostral) und Retraktion (Bewegung nach kaudal) der Vibrissen zuständig sind, werden in zwei Gruppen unterteilt: die Intrinsischen und Extrinsischen. Diese Unterteilung erfolgt anhand der Ursprungs- und Ansatzpunkte dieser Muskeln. Die intrinsischen Muskeln haben keinen Kontakt zu knöchernen Strukturen und somit ihren Ursprung und Ansatz in der Schnurrhaarregion selbst; die Extrinsischen hingegen setzen zwar in der Schnurrhaarregion an, haben jedoch ihren Ursprung auf verschiedene Bereiche des Schädelknochens und/oder des Nasenknorpels.<sup>17,21</sup>

Zu den extrinsischen Muskeln gehören der *M. nasolabialis*, der *M. maxillolabialis*, der *M. nasolabialis superficialis*, die *Pars orbicularis oris* des *M. buccinatorius* und der *M. nasolabialis profundus* (mit seinen fünf zur Schnurrhaarregion gehörenden *Partes*).<sup>17</sup>

Der *M. nasolabialis* (entspricht dem *M. levator labii superioris* der Maus), der in dieser Studie behandelt wird, hat seinen Ursprung im Stirnbein (*Os frontale*). Er erreicht die Schnurrhaarregion von dorsokaudal und teilt sich in sechs Bündel, die oberflächlich unter der Haut verlaufen. Vier von diesen Bündeln verlaufen zwischen den waagerechten Schnurrhaar-Reihen, eins weiter dorsal von der Reihe A und eins weiter ventral von der Reihe E (s. Abbildung 1).<sup>17,21</sup> Da sich die Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. Angelov seit 1992 mit den morphologischen und funktionellen Aspekten der Erholung nach Läsionen des *N. facialis* sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen beschäftigt, wurde entschieden, den *M. nasolabialis* der Ratte als *M. levator labii superioris* – in Analogie zu der Bezeichnung bei der Maus – zu benennen. Somit konnte die Qualität der Reinnervation der Schnurrhaarmuskulatur nach einer Fazialisläsion im gleichen Muskel (und mit dem gleichen Namen) bei Mäusen und Ratten beschrieben werden.

Die intrinsischen Muskeln sind – im Gegensatz zu den extrinsischen – zahlreich; diese verbinden jeweils zwei benachbarten Schnurrhaarfollikeln der gleichen Reihe. Dies wird durch ihre schlingenförmige Form erreicht; dabei wird jeweils das rostral liegende Schnurrhaar im unteren Drittel umschlungen. Diese Schlinge ist im oberen Drittel des davon kaudal liegenden Schnurrhaars befestigt. Intrinsische Muskeln befinden sich in allen Follikeln der Reihen A, B und  $\alpha$ – $\delta$ , sowie in den ersten sechs oder sieben Follikeln der Reihen C–E.<sup>17,21</sup>

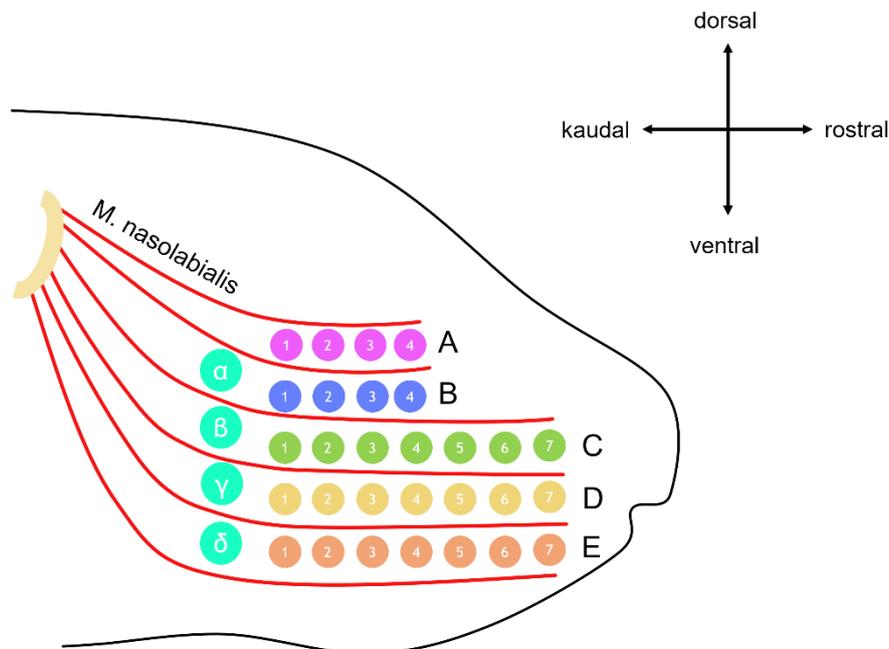


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Organisation der Vibrissen in der Schnurrhaarregion der Ratte. Die Vibrissen sind in fünf waagerechten (A–E) Reihen und einer sich kaudal davon befindlichen senkrechten ( $\alpha$ – $\delta$ ) Reihe angeordnet. Abgebildet wird außerdem der Verlauf des extrinsischen *Musculus nasolabialis*, der in dieser Studie behandelt wird. In Anlehnung an BOSMAN ET AL. (2011).

### 2.3.2. Muskelbeteiligung bei der aktiven Exploration

Bei der aktiven Exploration, während der die Ratten in der vorliegenden Studie beobachtet wurden, kommt es zu dem sogenannten *Whisking* (in der Literatur auch als *Sniffing* bezeichnet). Dieser Begriff beschreibt Zyklen abwechselnder Pro- und Retraktion der Vibrissen mit einer Frequenz von ca. 5–15 Hz.<sup>22,23</sup> An diesem Prozess sind sowohl die intrinsischen als auch die extrinsischen Muskeln beteiligt.<sup>23</sup> Bei der Protraktion kommt es initial zu einer Kontraktion des *M. nasolabialis profundus* (frühe Protraktion), auf die eine Kontraktion der intrinsischen Muskeln (späte Protraktion) folgt. Im Gegensatz dazu werden für die Retraktion die extrinsischen Muskeln *M. maxillolabialis* und *M. nasolabialis* aktiviert.<sup>17,24</sup>

### 2.3.3. Innervation der Schnurrhaarmuskeln und makroskopische Anatomie des extratemporalen *N. facialis*

Sowohl die intrinsischen als auch die extrinsischen Muskeln werden von Ästen des *N. facialis* innerviert.<sup>19,23</sup> Nachdem der *N. facialis* das Schläfenbein (*Os temporale*) durch das *Foramen styломastoideum* verlässt, teilt er sich extratemporal in mehrere Äste auf: den *R. auricularis posterior*, den *R. temporalis*, den *R. zygomaticus*, den *R. buccalis*, den *R. marginalis mandibulae*, die *Rr. cervicales*, den *R. stylohyoideus* und den *R. digastricus posterior* (s. Abbildung 2).<sup>25</sup> Für die Innervation der Schnurrhaarmuskulatur notwendig sind Fasern sowohl aus dem *R. buccalis* als auch aus dem *R. marginalis mandibulae*.<sup>25,26</sup> Diese beiden Äste verschmelzen miteinander proximal der Schnurrhaarregion und bilden zusammen den sogenannten *distalen Pes*. Aus diesem entspringen drei Zweige, die distal zur Schnurrhaarregion ziehen, um die dortigen Muskeln zu innervieren (s. Abbildung 2).<sup>26,27</sup> SEMBA ET AL. (1986) sowie HENSTROM ET AL. (2012) haben gezeigt, dass die beiden Äste (*R. buccalis* und *R. marginalis mandibulae*) auch unabhängig voneinander die Innervation der Schnurrhaarregion aufrechterhalten können. Denn es kam zu einem Sistieren der Bewegung der Vibrissen erst nach Durchtrennung beider Zweige.<sup>25,26</sup>

### 2.3.4. Vorteile der Untersuchungen am Modell des *N. facialis*

Die Auswirkungen peripherer Läsionen auf das periphere (PNS) und zentrale Nervensystem (ZNS) werden in den letzten Jahrzehnten zunehmend am Modell des *N. facialis* untersucht. Dieses Modell weist mehrere Vorteile auf, die solche Untersuchungen vereinfachen.

Zunächst ist der chirurgische Eingriff schnell und unkompliziert durchzuführen und kann einfach reproduziert werden.<sup>28</sup> Der Nerv ist leicht zugänglich und die verschiedenen Äste lassen sich gut identifizieren.<sup>26</sup>

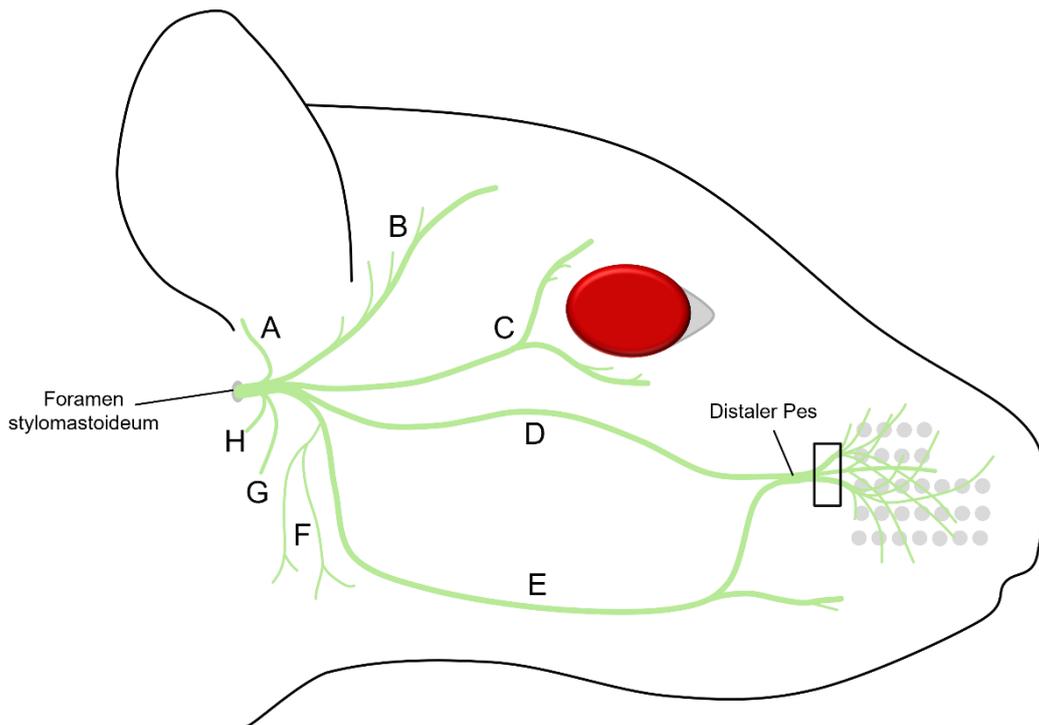


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Innervation der Schnurrhaarregion durch Äste des Nervus (*N.*) *facialis* bei der Ratte. Der *N. facialis* verlässt das Schläfenbein durch das *Foramen stylo-mastoideum* und verzweigt sich anschließend in mehrere Äste. **A**, *Ramus (R) auricularis posterior*; **B**, *R. temporalis*; **C**, *R. zygomaticus*; **D**, *R. buccalis*; **E**, *R. marginalis mandibulae*; **F**, *Rami cervicales*; **G**, *R. stylohyoideus*; **H**, *R. digastricus posterior*. Abgebildet ist außerdem der distale *Pes*, der durch die Verschmelzung des *R. buccalis* und *R. marginalis mandibulae* entsteht, sowie die drei Zweige, die aus diesem entspringen (durch die Einrahmung hervorgehoben). In Anlehnung an HENSTROM ET AL. (2012).

Sehr vorteilhaft ist darüber hinaus, dass die Folgen der Operation für das Tier im Vergleich zu anderen Modellen milder ausfallen.<sup>29</sup> Infektionen und starke Blutungen sind selten.<sup>28</sup> Auf der Höhe des Nerven, wo die Läsion herbeigeführt wird, verlaufen außerdem nur motorische Fasern.<sup>29</sup> Die daraus resultierende Fazialisparese wird dementsprechend von den Tieren gut vertragen und vitale Funktionen werden nicht bedroht.<sup>28</sup>

Ein weiterer wichtiger Vorteil besteht darin, dass die operierte Seite gleichzeitig mit der kontralateralen, gesunden Seite am gleichen Tier verglichen werden kann. Das wird durch ein hohes Maß an Symmetrie der Innervation der beiden Seiten ermöglicht. Dank dieser kann das Ausmaß der Wiederherstellung der ursprünglichen Funktion auf der operierten Seite schnell und oberflächlich beurteilt werden.<sup>28</sup> Die nicht operierte, kontralaterale Seite wird jedoch nicht als Kontrolle verwendet. Das liegt daran, dass die kontralaterale Muskulatur hypertrophiert, um die durch die Denervation bedingte Paralyse der ipsilateralen Muskeln zu kompensieren.

Die Untersuchung der Zellkörper der Motoneuronen ist mithilfe dieses Modells ebenfalls deutlich einfacher als bei anderen Modellen. Da es sich beim *N. facialis* um einen Hirnnerv handelt, sind die Zellkörper der Motoneuronen in dem motorischen Kerngebiet des *N. facialis* (*Nucleus nervi facialis*) im *Pons* (Hirnstamm) organisiert.<sup>28</sup> Dieses Kerngebiet bleibt bei einer peripheren

Läsion des *N. facialis* intakt, da es – durch den räumlichen Abstand zwischen dem (peripheren) Läsionsort und dem Hirnstamm – zu keiner traumatischen Verletzung des ZNS oder Unterbrechung der Blut-Hirn-Schranke kommt.<sup>28,29</sup>

Die oben genannten Gründe erklären daher, warum dieses Modell für ein breites Spektrum an Studien verwendet wird. Denn es können (nach einer peripheren Läsion) nicht nur periphere Prozesse, wie die De- und Regeneration der Axone beobachtet werden, sondern auch zentrale Prozesse, wie beispielsweise die Folgen der Läsion im motorischen Kerngebiet auf Hirnstammebene.<sup>28</sup>

## 2.4. Neuroanatomische Grundlagen

### 2.4.1. Der Aufbau eines peripheren Nerven

Als peripherer Nerv wird ein Bündel von Nervenfasern bezeichnet, die von Bindegewebe umhüllt und somit zusammengehalten werden.<sup>30</sup> Jedes Axon wird von einer Schwann-Zelle umgeben (s. Abschnitt 2.5), die wiederum von einer Basallamina ummantelt wird. Außerhalb der Basallamina befindet sich das sogenannte Endoneurium, ein Raum, der Blutgefäße sowie wenige Fibroblasten, Makrophagen und Mastzellen enthält. Die Axone, die im Endoneurium liegen und von diesem einzeln umgeben werden, bilden einen Faszikel. Dieser wird von dem Perineurium umhüllt (s. Abbildung 3). Das Perineurium kann – abhängig von dem Durchmesser des jeweiligen Nerven – aus einer oder mehreren Schichten von Perineuralzellen beste-

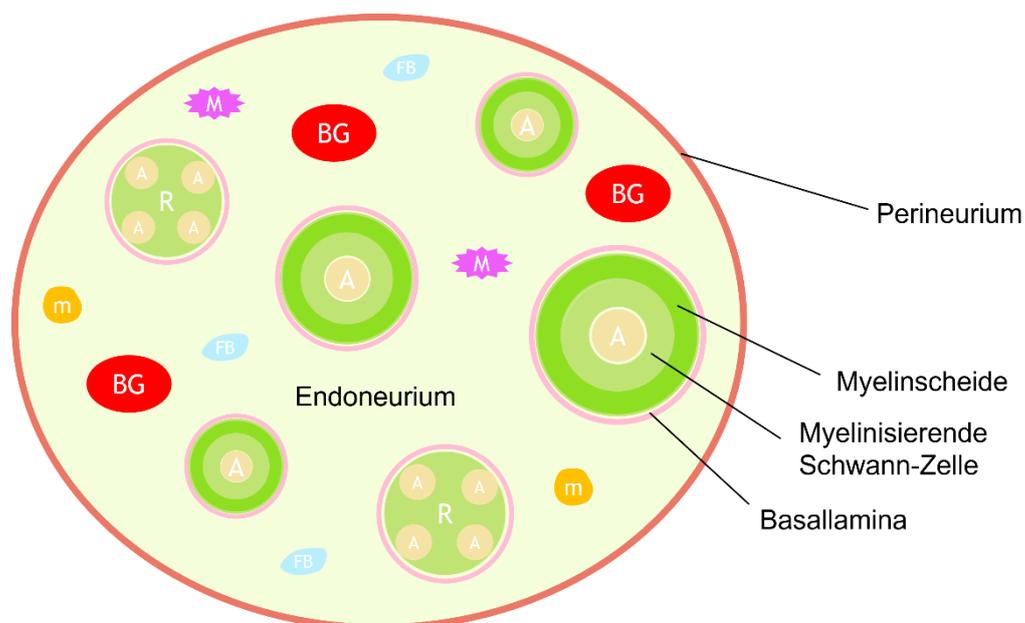


Abbildung 3: Vereinfachte schematische Darstellung des Aufbaus eines Faszikels, der von Perineurium umhüllt wird. **A**, Axon; **R**, Remak-Schwann-Zelle; **BG**, Blutgefäß; **FB** Fibroblast; **M**, Makrophage; **m**, Mastzelle. In Anlehnung an JESSEN ET AL. (2019).

hen. Kleine Nerven bestehen aus einem einzelnen Faszikel; Größere hingegen besitzen mehrere Faszikel, die durch eine weitere äußere Bindegewebsschicht, das Epineurium, zusammengehalten werden.<sup>30,31</sup>

### 2.4.2. Das Motoneuron

Die Nervenzelle (*syn.* Neuron) stellt die funktionelle Einheit des Nervensystems dar. Bei den Motoneuronen handelt es sich um einen Nervenzelltyp, der die Verbindung zwischen dem ZNS und Effektorzellen, beispielsweise Skelettmuskelzellen (*syn.* Muskelfasern), herstellt.<sup>30</sup> Mehrere Tausend solche Motoneuronen verlaufen im *N. facialis*, um u. a. die mimische Muskulatur zu innervieren.<sup>32</sup>

Ein Motoneuron besteht aus drei Teilen: dem Zellkörper (*syn.* Perikaryon), den Dendriten und dem Axon. Im Zellkörper befindet sich der Zellkern sowie weitere Organellen, die für die Aufrechterhaltung der Zelle notwendig sind. Sowohl die Dendriten als auch das Axon gehen aus dem Zellkörper hervor. Die Dendriten sind jedoch üblicherweise kürzer im Vergleich zum Axon. Eine Nervenzelle hat außerdem immer nur ein Axon; bei den sogenannten multipolaren Neuronen – zu denen die Motoneuronen gehören – sind dagegen mehrere (jedoch mindestens zwei) Dendriten vorhanden. Obwohl es nur ein Axon gibt, ist es trotzdem möglich, dass es sich in seinem Verlauf verzweigt; so entsteht eine sogenannte Axonkollaterale (*engl. axon collateral*).<sup>1,30</sup> In der Nähe seiner Effektorzelle verzweigt sich das Axon in zahlreiche terminale Äste (*engl. terminal branches*). Jedes dieser terminalen Äste bildet an seinem Endbereich eine kolbenförmige Verdickung, das sogenannte Axonterminal (*syn.* synaptischer Endkolben oder präsynaptische Endigung; *engl. axon terminal, synaptic bouton*).<sup>1,30,33</sup>

### 2.4.3. Anatomische und physiologische Grundlagen der neuromuskulären Endplatte

Neuronen kommunizieren und interagieren mit weiteren Neuronen oder mit Effektorzellen über Synapsen.<sup>30</sup> Eine Synapse stellt dementsprechend eine spezialisierte Kontaktstelle dar, an der der Signalaustausch stattfindet.<sup>1</sup>

Die Synapse zwischen einem terminalen Ast bzw. Axonterminal und einer Muskelfaser wird als neuromuskuläre Endplatte (NMJ; *syn.* motorische Endplatte; *engl. neuromuscular junction (NMJ) oder motor end plate*) bezeichnet.<sup>30</sup> Ein Motoneuron kann durch seine zahlreichen terminalen Äste mehrere Muskelfasern innervieren. Dabei kommt jedes Axonterminal in Kontakt mit einer einzelnen NMJ bzw. Muskelfaser.<sup>34</sup> Das Motoneuron mitsamt aller Muskelfasern, die von diesem innerviert werden, wird als motorische Einheit bezeichnet.<sup>30,34</sup>

Die NMJ setzt sich aus mehreren Bestandteilen zusammen. Dazu gehört das oben erwähnte Axonterminal des Motoneurons. Ein weiterer Bestandteil ist die sogenannte Endplatte, der postsynaptische spezialisierte Bereich des Sarkolemm (d. h. der Plasmamembran der Muskelfaser), wo der Kontakt zum Axonterminal hergestellt wird.<sup>34,35</sup> Das Axonterminal liegt der Muskelfaser nicht direkt an; zwischen den beiden gibt es den ca. 30–50 nm breiten synaptischen Spalt.<sup>34</sup> Dieser ist mit extrazellulärer Matrix gefüllt, die sich zu einer Basallamina organisiert (s. Abbildung 4). Die Basallamina besteht aus mehreren Proteinen und Signalmolekülen, die wichtige Funktionen für die Bildung, Organisation und Aufrechterhaltung der NMJs, sowie für eine stabile Neurotransmission, erfüllen.<sup>36,37</sup>

Im Bereich der NMJ gibt es außerdem zwei weitere Zelltypen: die terminalen Schwann-Zellen (tSCs, *syn.* perisynaptische Schwann-Zellen) und die Kranozyten. Die tSCs bedecken das Axonterminal kappenförmig, ohne es jedoch komplett zu umschließen (s. Abschnitt 2.5).<sup>38,39</sup> Die Kranozyten bedecken wiederum kappenförmig die komplette NMJ mitsamt der tSCs (s. Abbildung 4). Die Funktion der Kranozyten ist noch nicht abschließend geklärt, sie scheinen jedoch bei der Antwort der NMJ auf Denervation oder Paralyse eine Rolle zu spielen (s. Abschnitt 2.6.4).<sup>40</sup>

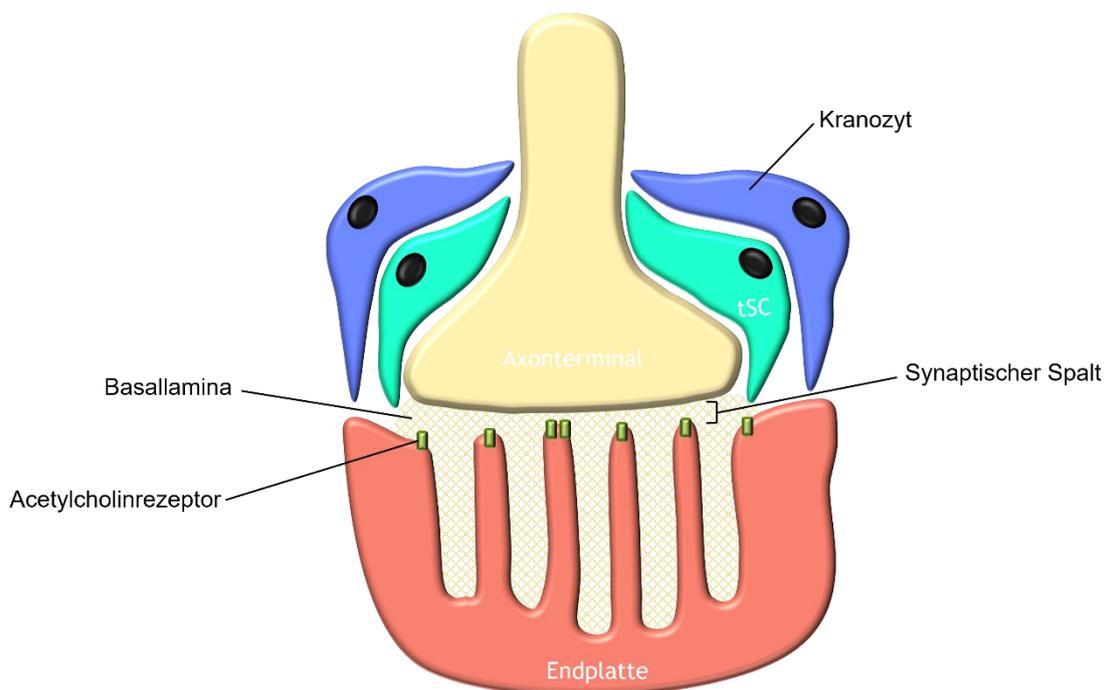


Abbildung 4: Vereinfachte schematische Darstellung der neuromuskulären Endplatte. Diese besteht aus vier Zelltypen: das Neuron bzw. dessen Axonterminal, die Muskelfaser bzw. deren Endplatte, die terminalen Schwann-Zellen (tSC) sowie die Kranozyten. Zwischen dem Axonterminal und der Endplatte befindet sich der synaptische Spalt, der mit extrazellulärer Matrix – organisiert in einer Basallamina – gefüllt ist. Die Acetylcholinrezeptoren auf der postsynaptischen Membran werden durch das (von dem Axonterminal freigesetzte) Acetylcholin aktiviert, was die anschließende Kontraktion der Muskelzelle zur Folge hat. In Anlehnung an COURT ET AL. (2008) und VALDEZ (2020).

Bei der NMJ handelt es sich um eine chemische Synapse. Bei dieser Art von Synapsen wird das elektrische Signal, das von dem Motoneuron geleitet wird, in ein chemisches Signal umgewandelt. Dies erfolgt durch Freisetzung von Neurotransmittern aus dem Axonterminal in den synaptischen Spalt. Der Neurotransmitter, der nachfolgend von der postsynaptischen Membran der Nerven- oder Effektorzelle aufgenommen wird, erzeugt dann erneut ein elektrisches Signal in dieser.<sup>1,30</sup>

Vereinfacht erklärt, kommt es im Fall der NMJ zu der Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin aus dem Axonterminal des Motoneurons in den synaptischen Spalt (nachdem das elektrische Signal an der NMJ eingetroffen ist). Acetylcholin diffundiert durch den synaptischen Spalt und aktiviert schließlich nikotinische Acetylcholinrezeptoren an der postsynaptischen Membran der Muskelzelle. Im Anschluss daran kommt es zu einer Depolarisation der Plasmamembran der Muskelzelle, die wiederum zu einer Kontraktion dieser Muskelzelle führt.<sup>30</sup> Das Signal wird also initial elektrisch innerhalb des Motoneurons weitergeleitet, an der NMJ durch Acetylcholin-Freisetzung in ein chemisches Signal umgewandelt und letztlich in der Muskelzelle zurück in ein elektrisches Signal übersetzt.<sup>1</sup>

## 2.5. Schwann-Zellen

Die Schwann-Zellen (SCs) gehören zu den Stützzellen des PNS, den sogenannten peripheren Gliazellen (*syn.* periphere Neuroglia). Die SCs leiten keine Signale selbst, erfüllen jedoch wichtige Funktionen, die sowohl das intakte als auch das beschädigte Neuron unterstützen und aufrechterhalten. Dazu zählt beispielsweise die Myelinisierung, die der elektrischen Isolierung und dem mechanischen Schutz der Axone dient, sowie die unterstützende Rolle bei der axonalen Regeneration und Reinnervation der Effektorzellen nach einer Läsion.<sup>1,30,33,41</sup>

Die SCs werden in zwei Gruppen unterteilt: die Myelinisierenden und die Nicht-myelinisierenden.<sup>41</sup> Die myelinisierenden SCs (mSCs; *engl. myelinating Schwann cells*) befinden sich entlang des Axons einer Nervenzelle, jedoch nicht im Bereich der terminalen Äste.<sup>30,39,41</sup> Sie bilden im Rahmen der sogenannten Myelinisierung eine mehrschichtige lipidreiche Hülle – die Myelinscheide – um jeweils ein 0,08–0,1 mm langes Segment eines einzigen Axons. Ein Axon, das von mSCs umhüllt wird, wird als markhaltiges oder myelinisiertes Axon bezeichnet (s. Abbildung 3). Die Myelinscheide isoliert die Axone elektrisch und führt dadurch dazu, dass das Signal deutlich schneller weitergeleitet wird.<sup>1,30</sup> In den letzten Jahren wurde ferner festgestellt, dass sich die Rolle dieser Zellen nicht nur auf die Myelinisierung beschränkt. Denn sie bieten

– neueren Studien zufolge – ihren umhüllten Axonen metabolische Unterstützung (*engl. metabolic support*) und fördern somit deren Überleben und Integrität.<sup>42,43</sup>

Zu den nicht-myelinisierenden SCs gehören die Remak-SCs, die bereits erwähnten terminalen SCs (tSCs) sowie SC-Sonderformen, die vorübergehend im Rahmen des Reparaturprozesses nach einer Läsion auftreten. Zu Letzteren gehören die Reparatur-SCs (rSCs; *syn.* Büngner-SCs; *engl. repair* oder *Büngner Schwann cells*) sowie die sogenannten Brücken-SCs (bSC; *engl. bridge Schwann cells*).

Die – nach ihrem Erstbeschreiber benannten – Remak-SCs umhüllen mehrere kleinere Axone gleichzeitig, ohne sie zu myelinisieren (s. Abbildung 3). Hierdurch entstehen die sogenannten Remak-Bündel.<sup>44</sup> Trotz der fehlenden Myelinisierung spielen diese Zellen eine essenzielle Rolle für die physiologische Funktion des PNS, indem sie u. a. auch an der metabolischen Unterstützung ihrer umhüllten Axone beitragen.<sup>42–44</sup>

Die tSCs bilden Fortsätze, mit denen sie die Axonterminale im Bereich der NMJ – wie in Abschnitt 2.4.3 bereits erwähnt – kappenförmig bedecken.<sup>38,39</sup> Zahlreiche Studien der letzten Jahrzehnte haben gezeigt, dass diese Zellen ein großes Spektrum an Aufgaben erfüllen. Zunächst sind sie unentbehrlich für die langfristige Aufrechterhaltung der adulten und sich entwickelnden NMJs. REDDY ET AL. (2003) haben dies in einem Frosch- und Kaulquappenexperiment gezeigt, bei dem eine Methode entwickelt wurde, um gezielt tSCs zu entfernen. Kurzfristig (eine Woche lang) hat sich an der Struktur und Funktion der adulten NMJ (im Frosch) nichts geändert; im Verlauf kam es jedoch zu einer Retraktion von terminalen Ästen und die präsynaptische Funktion hat um die Hälfte abgenommen. Bei der Kaulquappe (sich entwickelnde NMJs) wurden in Abwesenheit von tSCs die bereits bestehenden NMJs zurückgezogen, während keine neuen NMJs gebildet wurden.<sup>45</sup> Letzteres zeigt auch, dass die tSCs an der postnatalen Bildung von neuen Synapsen – der sogenannten *Synaptogenese* – beteiligt sind.<sup>39,45</sup> Wesentlich ist zudem die Beteiligung der tSCs an der Reinnervation der NMJs nach einer Nervenläsion, die durch die Bildung und Ausbreitung mehrerer langer Fortsätze gewährleistet wird.<sup>46</sup> Dies wird im Abschnitt 2.6.4 näher behandelt.

Die rSCs stellen eine SC-Sonderform dar, die nur nach einer Nervenläsion im distalen Stumpf vorübergehend auftritt. Die denervierten SCs – d. h. die SCs, die den Kontakt zu ihrem Neuron und proximalen Axon durch die Nervenläsion verloren haben – entlang des distalen Stumpfs dedifferenzieren und wandeln sich somit in rSCs um. Diese Zellen verlieren demnach ihre oben beschriebene Differenzierung zur Myelinisierung und Aufrechterhaltung des Neurons und aktivieren stattdessen ein Reparaturprogramm, um die regenerierenden Axone zu unterstützen.<sup>47</sup> Die genauen Abläufe und Rollen der rSCs werden im Abschnitt 2.6.2 näher beschrieben.

Bei den bSCs handelt es sich ebenfalls um eine SC-Sonderform, die nach einer Läsion vorübergehend im proximalen und im distalen Stumpf in direkter Nähe zur Läsion auftritt. Sie sind – ähnlich wie die rSCs – dedifferenzierte SCs.<sup>31,48</sup> Die bSCs bilden Stränge entlang der Nervenbrücke, die den proximalen und distalen Stumpf verbinden und somit einen Migrationspfad für die regenerierenden Axone legen. Auf solchen Strängen wachsen dann die regenerierenden Axone von proximal nach distal (s. Abschnitt 2.6.3).<sup>48,49</sup>

## **2.6. Postläsionale Abläufe in peripheren Nerven**

### **2.6.1. Häufig untersuchte Läsionsarten peripherer Nerven**

Es gibt zwei Arten von Läsionen, die häufig in Experimenten untersucht werden: die Nervenquetschung (*engl. crush injury*) and die Nervendurchtrennung (*engl. cut injury*).<sup>49,50</sup> Die Nervenquetschung entspricht der *Axonotmesis* in Seddons Klassifikation, bei der die Axone zwar ihre Kontinuität verlieren, die umgebenden Bindegewebsstrukturen jedoch erhalten bleiben. Im Gegensatz dazu entspricht die Nervendurchtrennung der *Neurotmesis* in Seddons Klassifikation. In diesem Fall verlieren sowohl die Axone als auch die umgebenden Bindegewebsstrukturen ihre Kontinuität.<sup>51</sup>

In der Literatur und im Folgenden wird darüber hinaus der Begriff *Axotomie* (*engl. axotomy*) verwendet, um eine Läsion zu beschreiben, die das proximale Axon von dem Zielgewebe bzw. das distale Axon von dem neuronalen Zellkörper trennt.<sup>50,52</sup> Unter diesen Oberbegriff fallen somit sowohl die Nervenquetschung als auch -durchtrennung, da es bei beiden Läsionsarten zu einer Diskontinuität der Axone kommt. Da in der vorliegenden Arbeit eine Durchtrennung des *N. facialis* – und somit seiner Motoneuronen – durchgeführt wurde, werden in den nächsten Abschnitten die Abläufe erläutert, die nach einer Durchtrennung von myelinisierten Axonen – zu denen die Motoneuronen gehören – stattfinden.

### **2.6.2. Abläufe im distalen Stumpf**

Im Anschluss an eine periphere Nervendurchtrennung kommt es zu der sogenannten Waller-Degeneration, bei der das Axon distal der Läsion degeneriert und in Fragmente gespalten wird (s. Abbildung 5B).<sup>53,54</sup>

Es kommt anschließend zu der Dedifferenzierung der denervierten mSCs distal der Läsion und somit zu deren Umwandlung in rSCs.<sup>47</sup> Diese Umwandlung geht mit einer zweifachen Elongation der Ersteren und oft einer Entwicklung von langen Fortsätzen einher. Diese elongierten Zellen organisieren sich zu Säulen, den sogenannten Büngner-Bändern.<sup>49,55</sup> Derartige Säulen bilden sich innerhalb der Basallamina, die vor der Läsion ein Axon mitsamt seiner SCs

röhrenförmig umhüllt hat (s. Abschnitt 2.4.1 und Abbildung 3).<sup>49,54,55</sup> Die Büngner-Bänder sind für die Regeneration unentbehrlich, da sie die regenerierenden Axone zurück zu ihrem Zielgewebe leiten.<sup>49,55</sup>

Bei der Umwandlung der mSCs in rSCs werden außerdem Myelin-assoziierte Gene herunterreguliert, während Gene, die für unreife SCs charakteristisch sind, hochreguliert werden.<sup>49</sup> Neben der Unterbrechung der Myelinproduktion kommt es zu der Entfernung des bereits vorhandenen Myelins bzw. der Myelinrückstände. Diese Aufgabe wird initial von den rSCs übernommen, die die sogenannte *Myelinophagie* einleiten; darunter wird die Autophagie des Myelins durch die rSCs selbst verstanden.<sup>56</sup> Die Auflösung des Myelins ist von großer Bedeutung, da die Myelinrückstände ein Hindernis darstellen, das die Axonregeneration verzögert bzw. inhibiert.<sup>53,57</sup>

Zudem setzen die rSCs zahlreiche Zytokine frei, die Makrophagen und weitere Immunzellen anlocken. Die Makrophagen unterstützen die rSCs darin, die Myelinrückstände und Axonfragmente zu phagozytieren und diese somit erfolgreich zu eliminieren.<sup>31,49,56</sup> Außerdem spielen die angelockten Makrophagen eine entscheidende Rolle im Bereich der Läsion, indem sie die Vaskularisation der Nervenbrücke fördern (s. Abschnitt 2.6.3).<sup>58</sup>

Eine weitere Funktion der rSCs stellt die Hochregulierung der Expression von neurotrophen Faktoren dar, die u. a. das Überleben und die postläsionale Regeneration der Axone fördern (s. Abschnitt 2.8).<sup>49,59,60</sup>

Im Verlauf kommt es zu der Rückwandlung der rSCs in mSCs, die mit einer ca. siebenfachen Verkürzung der Ersteren einhergeht. Hierdurch werden die regenerierten Axone remyelinisiert.<sup>55</sup>

### **2.6.3. Abläufe am Ort der Läsion**

Nach einer Nervendurchtrennung entsteht ein Spalt zwischen den beiden Nervenstümpfen. In diesem Spalt entwickelt sich neues Gewebe, das eine Verbindung zwischen den beiden Stümpfen herstellt. Dieses – initial aus Entzündungszellen und extrazellulärer Matrix bestehende – Gewebe wird als *Nervenbrücke* (*engl. nerve bridge*) bezeichnet.<sup>58</sup>

Die Brücke entwickelt sich bei Ratten in den allermeisten Fällen zwei Tage nach der Nervendurchtrennung und besteht zu dieser Zeit hauptsächlich aus Makrophagen (50 %) und neutrophilen Granulozyten (24 %), sowie zu einem kleineren Anteil aus Fibroblasten (13 %) und Endothelzellen (5 %). Die Brücke ist zunächst nicht vaskularisiert und ihr Milieu daher hypoxisch. Die lokalen Makrophagen reagieren auf diese Hypoxie, indem sie VEGF-A (*engl. vascular endothelial growth factor-A*) freisetzen.<sup>58,61</sup> VEGF-A – als bekannter potenter Regler der Angiogenese – führt zur Bildung von Blutgefäßen im Bereich der Brücke.<sup>58,61,62</sup> Entsprechend steigt

auch der Anteil der Endothelzellen – d. h. der Bausteine der Blutgefäße – am dritten Tag nach der Nervendurchtrennung von 5 % auf ca. 20 % der lokal vorliegenden Zellen an.<sup>58</sup>

Die bSCs, die sich an den beiden Spitzen der Nervenstümpfe bzw. an den beiden Enden der Nervenbrücke befinden, proliferieren und fangen an, Stränge zu bilden und somit in die Zellbrücke zu migrieren.<sup>48</sup> Die bSCs scheinen jedoch nicht in der Lage zu sein, alleine – d. h. ohne einen anderen Zelltyp als Gerüst zu nutzen – in die Brücke zu migrieren und diese zu durchqueren. CATTIN ET AL. (2015) zeigten, dass die bSC-Stränge die oben erwähnten neu gebildeten Blutgefäße als Gerüst nutzen.<sup>58</sup> CHEN ET AL. (2019) zeigten in einer späteren Studie, dass die bSCs im proximalen Stumpf zunächst die regenerierenden Axone als Substrat für ihre Migration nutzen, bevor sie anschließend die Führung übernehmen und den Axonen vorausgehen. Es lässt sich daher aus beiden Studien darauf schließen, dass bSCs möglicherweise in der Lage sind, verschiedene Zelltypen als Substrat für ihre Migration zu nutzen.<sup>63</sup> Im Verlauf treffen sich dann die von proximal und distal ausgehenden Stränge in der Mitte der Brücke.<sup>48</sup>

Wenn die regenerierenden Axone den distalen Stumpf erreichen, finden sie ein für ihr weiteres Wachstum günstiges Milieu, geräumt von Axonfragment- und Myelinrückständen.<sup>61</sup> Dort können sie entlang der Büngner-Bänder (s. Abschnitt 2.6.2) wachsen, um den Bereich der NMJs bzw. der Effektorzellen zu erreichen.

#### **2.6.4. Abläufe im Bereich der neuromuskulären Endplatte**

Auch im Bereich der terminalen Äste kommt es zur Fragmentierung und somit zur Denervierung der tSCs (s. Abbildung 5B).<sup>64</sup> Letztere – ähnlich wie die mSCs entlang des Axons – dedifferenzieren sich und phagozytieren axonale Rückstände im Bereich der NMJ.<sup>64,65</sup>

Die regenerierenden Axone aus dem proximalen Stumpf wachsen entlang der Büngner-Bänder (s. Abschnitt 2.6.2) innerhalb der Basallamina (s. Abbildung 3) und kommen schließlich bei den denervierten NMJs an, die sie wieder besetzen.<sup>49,55,66–68</sup> Nach einer schweren Nervenläsion – wie beispielsweise einer Nervendurchtrennung – erreichen sie allerdings zu unterschiedlichen Zeitpunkten die denervierten NMJs. Das liegt einerseits daran, dass sie asynchron regenerieren und unterschiedlich schnell die Nervenbrücke durchqueren. Andererseits kommt es auch dazu, dass manche Axone nicht in der Lage sind, die Nervenbrücke überhaupt zu durchqueren. Das hat zur Folge, dass manche NMJs früher reinnerviert werden als andere und dementsprechend für eine Weile reinnervierte und noch denervierte NMJs gleichzeitig vorhanden sind (s. Abbildung 5C).<sup>39,69,70</sup>

Circa drei Tage nach der Läsion fangen die denervierten tSCs damit an, lange Fortsätze zu bilden, die sich jenseits der Grenzen der NMJ ausdehnen.<sup>46</sup> Diese Fortsätze nehmen Kontakt

zu Fortsätzen benachbarter NMJs auf und stellen Verbindungen zu diesen her. Solche Verbindungen werden als SC-Brücken (*engl. Schwann cell bridges*) bezeichnet und erfolgen vorzugsweise zwischen tSCs von noch denervierten und bereits reinnervierten NMJs (s. Abbildung 5C). Daraus resultiert ein komplexes Netzwerk aus tSC-Fortsätzen, das NMJs miteinander verbindet.<sup>68,71-74</sup>

Die Axone, die durch die Endoneuralscheide früher die NMJs erreichen, überschreiten oft die NMJ-Grenzen und nutzen die bereits gebildeten tSC-Fortsätze als Substrat, um benachbarte noch denervierte NMJs zu erreichen. Diejenigen Axone, die die Grenzen ihrer NMJ überschreiten, um zusätzlich zu ihrer eigenen noch benachbarte NMJs zu innervieren, werden als *escaped fibers* (*engl. für ‚entflohene Fasern‘*) bezeichnet (s. Abbildung 5D).<sup>67,68,71,75</sup> Es kommt oft vor, dass solche *escaped fibers* nach der Reinnervation einer benachbarten NMJ sogar in retrograder Richtung innerhalb der Endoneuralscheide weiterwachsen. Das Axon folgt dem Verlauf, der durch die (benachbarte) Endoneuralscheide vorgegeben wird, und wird von dieser zu weiteren NMJs geleitet. Es ist beispielsweise möglich, dass das gleiche Axon im Verlauf wieder in anterograder Richtung wächst, um eine dritte NMJ zu innervieren (s. Abbildung 5F). Durch diese Art und Weise wird sichergestellt, dass möglichst viele NMJs bzw. Muskelfasern schnell reinnerviert werden und infolgedessen die Muskelfunktion wieder hergestellt wird.<sup>67,69</sup> Es ist allerdings wichtig zu erwähnen, dass nicht jeder tSC-Fortsatz mit einem Axon assoziiert ist. KANG ET AL. (2019) stellten im Rahmen ihres Experiments in vielen Fällen fest, dass die Anzahl der tSC-Fortsätze jene der *escaped fibers* überschritt.<sup>69</sup> Nach der Reinnervation einer NMJ werden die tSC-Fortsätze mitsamt der entflohene Fasern zurückgezogen. Dies ist jedoch nicht der Fall, wenn eine Verbindung zwischen zwei NMJs durch eine entflohene Faser hergestellt wurde (s. Abbildung 5F).<sup>46,67,69</sup>

Wenig erforscht ist die Rolle der Kranozyten nach einer Nervenläsion. COURT ET AL. (2008) zeigten, dass diese Zellen nach der Denervation proliferieren und sich sogar vor den tSCs ausbreiten und Fortsätze bilden. Diese Fortsätze bilden – ähnlich wie die tSC-Fortsätze – Brücken und verbinden dadurch NMJs miteinander. Es wäre daher möglich, dass solche Brücken zwischen NMJs initial von Kranozyten gebildet und gefestigt werden und erst später als Substrat für die Ausbreitung von tSC-Fortsätzen verwendet werden.<sup>40</sup> Dies müsste jedoch durch weitere Experimente untersucht werden.

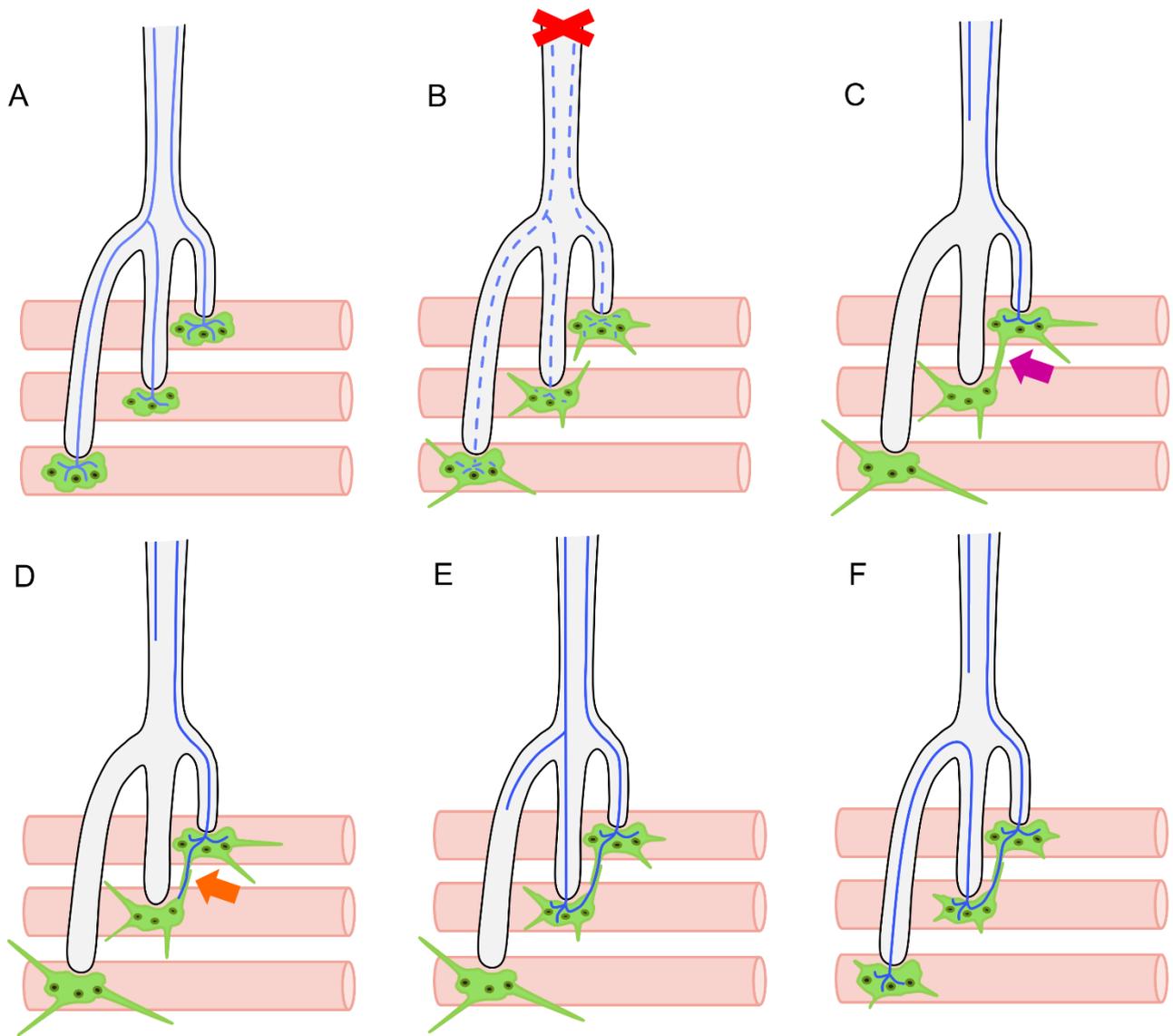


Abbildung 5: Vereinfachte schematische Darstellung der postläsionalen Abläufe im Bereich der neuromuskulären Endplatten (NMJs). Im Bild **A** wird der physiologische Zustand dargestellt: Drei terminale Äste (blau) innervieren drei Muskelfasern (rot). Dabei stammen der linke und mittlere terminale Ast aus dem gleichen Motoneuron, das sich in der Nähe des Muskels verzweigt. Der Kontakt zwischen Axon und Muskelfaser erfolgt im Bereich der NMJ, die von den terminalen Schwann-Zellen (tSCs; grün) kappenförmig bedeckt ist. Das rote Kreuz im Bild **B** stellt die Nervendurchtrennung dar. Im Anschluss an diese kommt es im distalen Stumpf zu der Waller-Degeneration, bei der die Axone degenerieren und in Fragmente gespalten werden. Die tSCs fangen außerdem damit an, lange Fortsätze zu bilden, um Kontakt zu benachbarten NMJs aufzunehmen. Im Verlauf bilden die jeweiligen tSC-Fortsätze eine Verbindung miteinander, die sogenannte SC-Brücke, die durch den violetten Pfeil im Bild **C** hervorgehoben wird. Eine solche Brücke entsteht vorzugsweise zwischen einer reinnervierten und einer noch denervierten NMJ. Die regenerierenden Axone wachsen innerhalb der Endoneuralscheide (die einzelnen Endoneuralscheiden werden hier nicht abgebildet) und kommen schließlich im Bereich der NMJs an. Aus verschiedenen Gründen (s. Text) erreichen die Axone zu unterschiedlichen Zeitpunkten die NMJs, sodass gleichzeitig reinnervierte und noch denervierte NMJs vorhanden sind (Bild **C**). Die Axone, die früher die NMJs erreichen, überschreiten oft die NMJ-Grenzen und wachsen entlang der bereits gebildeten tSC-Fortsätze, um benachbarte NMJs zu reinnervieren. Solche Axone werden als *escaped fibers* bezeichnet. Der orangene Pfeil im Bild **D** zeigt eine solche *escaped fiber*, die die bereits gebildete SC-Brücke als Substrat nutzt, um eine benachbarte NMJ zu erreichen. Es ist möglich, dass eine NMJ sowohl durch ein Axon, das innerhalb der Endoneuralscheide wächst, als auch durch eine *escaped fiber* reinnerviert wird. In diesem Fall wird eine NMJ – wie diejenige auf der mittleren Muskelfaser im Bild **E** – polyneuronally innerviert. Es kommt auch vor, dass eine *escaped fiber* nach der Reinnervation einer benachbarten NMJ dem Verlauf der (benachbarten) Endoneuralscheide folgt und in retrograder Richtung und in diesem Beispiel erneut in anterograder Richtung weiterwächst, um eine dritte NMJ zu reinnervieren (Bild **F**). Somit wird möglicherweise sichergestellt, dass möglichst viele NMJs schnell reinnerviert werden. In Anlehnung an KANG ET AL. (2019) und SON ET AL. (1996).

## 2.7. Gründe für unzureichende Funktionswiederherstellung nach einer Nervenläsion

Trotz der ausgeprägten Regenerationsfähigkeit von peripheren Nerven kommt es nach einer Nervenläsion selten zu einer kompletten Wiederherstellung der ursprünglichen Funktion.<sup>76</sup> Mehrere Gründe und deren Zusammenspiel sind dafür verantwortlich.

Um regenerieren und später reinnervieren zu können, müssen die durchtrennten Nervenzellen überhaupt erst überleben. Obwohl die Neuronen im PNS nach einer Läsion in der Regel überleben und gut regenerieren, gibt es zwei entscheidende Faktoren, die ihre Überlebenswahrscheinlichkeit beeinflussen.<sup>77</sup> Einerseits spielt das Alter der Tiere eine essenzielle Rolle; in sehr jungen Tieren wird deutlich häufiger der neuronale Zelltod beobachtet als in älteren Tieren.<sup>77,78</sup> Andererseits ist der Abstand zwischen dem Läsionsort und dem Zellkörper maßgeblich für das Überleben der Zelle. Je näher die Läsion am Zellkörper ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es zum Zelltod kommt.<sup>77,79</sup>

Es ist darüber hinaus von großer Bedeutung, dass die regenerierenden Axone mit einem möglichst hohen Maß an Genauigkeit ihre ursprünglichen Muskelfasern reinnervieren. An dieser Stelle spielt auch die Art der Läsion eine wichtige Rolle. Wenn die Endoneuralscheide erhalten bleibt – wie im Fall einer Nervenquetschung – wachsen die regenerierenden Axone innerhalb von dieser und kommen somit zu ihrem ursprünglichen Ziel an. Im Gegensatz dazu ist es bei der Nervendurchtrennung und somit Unterbrechung der Endoneuralscheide unwahrscheinlich, dass die Axone den Weg zu ihrer ursprünglichen Endoneuralscheide im distalen Stumpf finden.<sup>49,51,66,80</sup> Ein Axon, das entlang einer anderen Endoneuralscheide als seiner ursprünglichen wächst, wird entsprechend zu einer anderen Effektorzelle bzw. Muskelfaser geleitet. Das führt zu einer schlechteren Wiederherstellung der Muskelkontrolle, da die Motoneuronen nun evtl. andere Muskeln – mit anderen Funktionen – als ihre ursprünglichen innervieren.<sup>80</sup>

In diesem Zusammenhang ist ebenfalls relevant, dass aus jedem durchtrennten Axon mehrere Kollateralen entspringen, ein Phänomen, das als *kollaterales axonales Branching* (engl. *collateral axonal branching*) bezeichnet wird.<sup>15,81,82</sup> Diese – aus einem einzelnen Axon stammenden – Kollateralen können in mehrere verschiedene Endoneuralscheiden hineinwachsen.<sup>83</sup> Es wurde – dazu passend – auch beobachtet, dass eine Endoneuralscheide mehrere Nervenfasern enthält.<sup>84</sup> Dies kann zum Phänomen der *Polyinnervation* führen; hier reinnerviert ein einziges Motoneuron durch seine Kollateralen mehrere Muskeln, die teilweise eine antagonistische Wirkung haben können.<sup>85</sup> Daraus resultiert auch die sogenannte *Hyperinnervation* der Muskeln; dieser Begriff beschreibt die Reinnervation eines jeweiligen Muskels durch mehr Motoneuronen als unter physiologischen Umständen.<sup>86</sup> Poly- und Hyperinnervation können – ähnlich wie oben – eine schlechtere Kontrolle der Muskulatur zur Folge haben und zur Ent-

stehung des sogenannten *autoparalytischen Syndroms* führen. Letzteres beschreibt das klinische Bild einer persistierenden partiellen Parese der Muskulatur, die nach einer schweren Nervenschädigung auftritt. Eine solche Schwäche der Muskulatur wird beobachtet, obwohl sich die Muskeln elektromyographisch als sehr gut reinnerviert zeigen. Dies ist auf die fehlerhafte Reinnervation der Muskeln zurückzuführen, bei der sowohl Agonisten als auch Antagonisten simultan von den gleichen Motoneuronen reinnerviert werden. Eine gleichzeitige Aktivierung von Muskeln mit antagonistischer Wirkung führt dementsprechend dazu, dass sich die Muskelaktionen gegenseitig blockieren und die Ausführung der Bewegung ausbleibt (Autoparalyse).<sup>87</sup>

Auch im Bereich der NMJs werden Phänomene beobachtet, die zu einer unzureichenden Funktionswiederherstellung beitragen können. NGUYEN ET AL. (2002) zeigten, dass nach einer Nervendurchtrennung weniger NMJs im Vergleich zu einer Nervenquetschung reinnerviert werden. Möglicherweise liegt dies daran, dass im Fall einer Nervendurchtrennung mehr Axone degenerieren bzw. weniger Axone regenerieren.<sup>66</sup>

Darüber hinaus kann es im Bereich der NMJs zu der sogenannten *polyneuronalen Innervation* kommen. Darunter wird die Reinnervation einer NMJ durch *mehr als ein* Motoneuron verstanden.<sup>85,88</sup> Dies erfolgt etwa, indem eine NMJ sowohl durch das regenerierende, in der Endoneuralscheide wachsende Axon als auch durch eine *escaped fiber* reinnerviert wird (s. Abbildung 5E).<sup>68,89</sup> Letztere ‚entfloh‘ aus einer benachbarten NMJ und stammt aus einem anderen Motoneuron als das, das die erste NMJ durch die Endoneuralscheide erreicht und diese innerviert. Dieser Fall birgt das Risiko, dass die zwei Motoneuronen, die die gleiche NMJ reinnervieren, asynchron Impulse abgeben und somit die Funktion dieser und infolgedessen der Muskelfaser beeinträchtigen.<sup>90</sup> Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass eine NMJ aus mehreren terminalen Ästen des *gleichen* Motoneurons innerviert wird, wobei es sich nicht um eine *polyneuronale* Innervation handeln würde. Dies wäre einerseits der Fall, wenn die *escaped fiber* aus einer Axonkollaterale des gleichen Motoneurons stammen würde. Andererseits kann dies auch durch das sogenannte *terminale oder intramuskuläre Sprouting* (engl. *terminal* oder *intramuscular sprouting*) begünstigt werden. Dieser Begriff beschreibt die Fähigkeit der regenerierten Axone, sich im Bereich der NMJs stark zu verzweigen.<sup>90,91</sup> Durch diese Verzweigung sind Motoneuronen in der Lage, das Drei- bis Fünffache an Muskelfasern im Vergleich zu der ursprünglichen Anzahl an von ihnen innervierten Fasern zu reinnervieren. Dieser Mechanismus dient vermutlich dazu, möglichst viele Muskelfasern zu reinnervieren, um die kleinere Anzahl an regenerierten Axonen bei chronischer Axotomie (s. u.) zu kompensieren.<sup>92,93</sup> Bei einem derartigen pathologischen Anstieg der Anzahl an terminalen Ästen aus dem gleichen Motoneuron ist es jedoch möglich, dass sowohl die *escaped fiber* als auch das aus der Endoneuralscheide kommende Axon aus dem gleichen Motoneuron stammen. Somit wird eine NMJ aus terminalen Ästen des *gleichen Motoneurons* reinnerviert. Da es nicht möglich ist, das komplizierte

Netzwerk an terminalen Ästen und ihren Ursprung nachzuverfolgen und Neuronen zu unterscheiden, wird in der Literatur und im Folgenden der Begriff *Polyinnervation der NMJs* verwendet, wenn eine NMJ von mehreren Axonterminalen innerviert wird.<sup>88</sup>

Eine andere entscheidende Komponente für unzureichende Funktionswiederherstellung ist der Abstand des Läsionsorts von dem Zielgewebe – hier die Muskulatur – und somit die Dauer bis die regenerierenden Axone ihr ehemaliges Zielgewebe reinnervieren. Ein durchtrenntes Axon wächst um ca. 1–3 mm/Tag. Bei einer von dem Muskel weit entfernten Läsion werden dementsprechend deutlich längere Zeiten für die Reinnervation gebraucht im Gegensatz zu einer Läsion, die sich in direkter Nähe zu dem Muskel befindet.<sup>52,59</sup>

Eine verlängerte Reinnervationszeit führt zu einer schlechteren Wiederherstellung der ursprünglichen Funktion; dies ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Erstens nimmt die Regenerationsfähigkeit der Motoneuronen bei chronischer Axotomie ab; demzufolge nimmt auch die Anzahl der regenerierenden Axone stark ab.<sup>92</sup> Die chronische Axotomie (*engl. chronic axotomy*) beschreibt den Zeitraum nach einer Läsion, während dessen die durchtrennten Axone noch keinen Kontakt zu ihrem Zielgewebe hergestellt haben.<sup>16,94</sup> Zweitens nimmt die Anzahl der regenerierenden Axone bei chronischer Denervation ebenfalls stark ab.<sup>95</sup> Als chronische Denervation (*engl. chronic denervation*) wird der Zeitraum nach einer Läsion bezeichnet, während dessen der distale Nervenstumpf sowie das Zielgewebe (in diesem Fall die Muskulatur) denerviert bleiben.<sup>94</sup> Drittens nimmt die Anzahl der chronisch denervierten SCs im distalen Stumpf zunehmend ab.<sup>31,96</sup> Die SCs verlieren zusätzlich zunehmend die Fähigkeit, die regenerierenden Axone trophisch zu unterstützen.<sup>31,97</sup> Viertens kommt es durch die lange Denervation zur Atrophie von Muskelfasern, die nach der Reinnervation nur teilweise rückgängig gemacht werden kann. Dementsprechend wird die ursprüngliche Größe der Muskelfasern nicht wieder erreicht, was wiederum eine Verminderung der Muskelkraft zur Folge haben kann.<sup>94,95</sup>

Bei längerer Denervation kommt es außerdem zu einem Remodeling der synaptischen Region. Im Laufe der Zeit verlassen tSCs bzw. deren Fortsätze Teile der NMJ. Solche Areale, die nicht mehr von tSCs oder deren Fortsätze bedeckt sind, verlieren im Verlauf auch ihre Acetylcholinrezeptoren. Dies wird möglicherweise dadurch erklärt, dass die tSCs ihre Fortsätze in die Umgebung – und somit außerhalb – der NMJ ausbreiten, um Kontakt zu benachbarten innervierten NMJs zu suchen und infolgedessen SC-Brücken zu bilden (s. Abschnitt 2.6.4). Wie bereits erläutert, wachsen die regenerierenden Axone – nachdem sie durch die Endoneuralscheide die NMJ erreichen – vorzugsweise entlang der tSC-Fortsätze. Dementsprechend werden diejenigen Bereiche der NMJ, die nicht mehr von tSCs bedeckt werden, seltener reinnerviert. Bei fehlender Reinnervation gehen auch die Acetylcholinrezeptoren zurück, was

eine Reduktion der synaptischen Fläche zur Folge hat. Letzteres könnte wiederum zu einer verminderten Funktionswiederherstellung beitragen.<sup>98</sup>

## 2.8. Neurotrophe Faktoren

Als neurotrophe Faktoren (NFs) werden Proteine bezeichnet, die ein großes – noch nicht abschließend geklärtes – Spektrum an Aufgaben erfüllen und ihre spezifische Wirkung auf Zellen (Neuronen und Glia) des PNS und ZNS ausüben.<sup>99,100</sup> Zu ihren Aufgaben zählen unter anderem das Überleben, das Wachstum und die Differenzierung von Neuronen.<sup>100,101</sup> Das Wort *trophisch* bzw. *trophischer Faktor* (griechisch *trophē* (τροφή), Nahrung) deutet auf diese Wachstums-, Aufrechterhaltungs- und Versorgungsfunktion hin und beschreibt Substanzen, die „den Fortbestand einer Zelle förder[n]“. <sup>99,102,103</sup>

Die NFs werden in fünf Familien unterteilt. Dies sind die:

1. **Neurotrophine** mit dem *Nerve growth factor* (NGF), *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und dem *Neurotrophin-3* sowie *-4/5* (NT-3, NT-4/5)
2. **Fibroblast-Growth-Factor-Familie** mit dem *Basic fibroblast growth factor* bzw. *Fibroblast growth factor 2* (bFGF, FGF-2), dem *Acidic fibroblast growth factor* (aFGF) und *Fibroblast growth factor 5* (FGF-5)
3. **Transforming-Growth-Factor- $\beta$ -(TGF- $\beta$ )-Superfamilie** mit dem *Glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), dem *Neurturin* (NTN) und dem *Persephin* (PSP)
4. **Neuropoietin-Familie** mit dem Neurozytokin *Ciliary neurotrophic factor* (CNTF) und
5. **Somatomedin-Familie** mit dem *Insulin-like growth factor I* und *II* (IGF-I, IGF-II).<sup>91</sup>

NFs werden im physiologischen Zustand an mehreren Orten synthetisiert. Klassischerweise werden sie von dem Zielgewebe freigesetzt und retrograd zum Zellkörper transportiert. Sie können allerdings auch von den Neuronen selbst produziert werden und autokrin wirken. Freigesetzt werden sie außerdem unter anderem von Fibroblasten, Makrophagen und Gliazellen, die sich in der Nähe von Zellkörper und Axon befinden.<sup>54,59,104</sup>

Nach einer Axotomie wird die Expression von NFs sowohl in den denervierten SCs im distalen Stumpf als auch im neuronalen Zellkörper selbst hochreguliert.<sup>47,50,59,60</sup> Dies ist von großer Bedeutung, da viele NFs insbesondere für das Überleben und teilweise für die Regeneration der durchtrennten Axone notwendig sind.<sup>59</sup>

Da in dieser Studie die Wirkungen von BDNF bzw. seinen neutralisierenden Antikörpern (anti-BDNF) und FGF-2 untersucht wurden, wird im Folgenden separat auf diese beiden Faktoren eingegangen.

### 2.8.1. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

BDNF gehört zu der Familie der Neurotrophine und ist strukturell eng mit dem *Nerve growth factor (NGF)* verwandt.<sup>101</sup> BDNF entfaltet seine Wirkung über die Bindung an zwei Rezeptorklassen. Es bindet selektiv an trkB, ein Mitglied der Tropomyosinrezeptorkinase-Familie (trk, engl. *tropomyosin receptor kinase*), und außerdem an p75, einen Rezeptor, der zu allen Neurotrophinen die gleiche, geringe Affinität hat.<sup>105</sup>

In adulten Säugetieren wird BDNF mRNA sowohl im ZNS in verschiedenen Regionen des Gehirns (u. a. Hippocampus [höchste Konzentration im Gehirn] und Kortex) und im Rückenmark als auch im PNS in Spinalganglien exprimiert. Auch in peripheren Geweben wurde BDNF mRNA festgestellt, unter anderem in Herz, Milz und in geringeren Konzentrationen in Skelettmuskeln.<sup>106–108</sup>

Mehrere Studien mit Nagetieren (Ratten und Mäuse) zeigten, dass nach einer Axotomie die Exprimierung von BDNF mRNA in den axotomierten Neuronen selbst, den rSCs des distalen Stumpfs, sowie der denervierten Target-Muskulatur hochreguliert wird.<sup>47,60,73,109–112</sup> In den axotomierten Motoneuronen des *N. facialis* wurde bei Ratten eine zwei- bis vierfach – im Vergleich zu der kontralateralen, gesunden Seite – erhöhte mRNA-Menge gemessen. Diese wurde bereits acht Stunden nach der Läsion beobachtet, erreichte ihr Maximum nach ein bis zwei Tagen und nahm daraufhin allmählich ab, bis sie am siebten Tag nach der Läsion den Werten der kontralateralen, gesunden Seite ähnelte. Dazu passend stieg die Menge des BDNF-Proteins 24 Stunden postläsional mehrfach an, erreichte ihr Maximum nach ca. fünf bis sieben Tagen und wurde mindestens zwei Wochen aufrechterhalten.<sup>111</sup> Im distalen Stumpf wurde in Ratten ein deutlicher Anstieg der mRNA-Menge erst sieben Tage nach der Läsion festgestellt, der sich über mehrere Wochen hinweg fortsetzte.<sup>109,110</sup> Auch der mRNA-Anstieg im Muskel erfolgte mit einer Verzögerung von einer Woche.<sup>110</sup> Durch die postläsionale Bereitstellung von BDNF aus verschiedenen Quellen (axotomiertes Neuron, denervierte SCs und Muskulatur) könnte sichergestellt werden, dass das durchtrennte Neuron im Laufe des gesamten Regenerationsprozesses mit BDNF versorgt wird.<sup>112</sup> Dies wäre aufgrund seiner vielfältigen Wirkungen von großer Bedeutung.

Zunächst ist endogenes BDNF notwendig für die Regeneration und Remyelinisierung von durchtrennten Neuronen. Dies wurde experimentell durch seine Neutralisierung mit Antikörpern (anti-BDNF) verdeutlicht, bei der eine deutliche Verzögerung der Axonregeneration und Remyelinisierung beobachtet wurde.<sup>112</sup> Außerdem fördert die exogene Gabe von BDNF das Überleben von axotomierten Motoneuronen in neonatalen Ratten sowie Motoneuronen nach einem Vorderwurzel-Ausriss in adulten Ratten.<sup>113,114</sup>

BOYD ET AL. (2002) zeigten außerdem, dass die exogene Verabreichung von BDNF dosisabhängig eine wichtige Rolle bei der Regeneration nach chronischer Axotomie zu spielen

scheint. Denn niedrigdosiertes BDNF (2 µg/Tag) war in der Lage, den schädlichen Wirkungen der zweimonatigen chronischen Axotomie entgegenzuwirken, indem es die Anzahl chronisch axotomierter Motoneuronen, die ihre Axone regenerierten, erhöhte. Bei direkter Reanastomosierung nach der Nervendurchtrennung war niedrigdosiertes BDNF dagegen nicht in der Lage, ihre Anzahl zu erhöhen. Bei Verabreichung hoher BDNF-Mengen (20 µg/Tag) nahm die Anzahl chronisch axotomierter Motoneuronen, die ihre Axone regenerierten, wiederum ab. Hohe BDNF-Konzentrationen führten auch bei direkter chirurgischer Rekonstruktion nach Nervendurchtrennung zu solchen inhibitorischen Effekten. Diese inhibitorische Wirkung wurde den p75-Rezeptoren zugeschrieben, deren Blockade zur Aufhebung dieser hemmenden Einflüsse führte.<sup>115</sup>

### 2.8.2. Fibroblast growth factor 2 (FGF-2)

Der Fibroblast growth factor 2 (FGF-2; *syn.* bFGF, *engl.* basic FGF) ist eins der – bis heute bekannten – 23 Mitglieder der FGF-Familie. Seine Wirkung wird durch die Bindung an zwei Rezeptorklassen vermittelt. Dazu gehören die hoch-affinen FGF-Rezeptoren (FGFR) und die niedrig-affinen Heparansulfat-Proteoglykane.<sup>116</sup>

FGF-2 mRNA und das entsprechende FGF-2 Protein kommen physiologisch im ZNS in Neuronen (u. a. des Tel- und Diencephalon) und nicht-neuronalen Zellen (z. B. Astrozyten) vor.<sup>117</sup> Auch im PNS wurde FGF-2 mRNA nachgewiesen, u. a. in SCs und Gefäßendothelzellen im intakten *N. ischiadicus*.<sup>118</sup>

Mehrere Wirkungen von FGF-2 zusammenhängend mit peripherer Regeneration wurden nachgewiesen. Zunächst ist FGF-2 ein potentes Mitogen und fungiert außerdem als Differenzierungsfaktor für verschiedene Zelltypen mesodermalen und neuroektodermalen Ursprungs.<sup>119,120</sup> Unter anderem wird seine mitogene Wirkung auch in SCs entfaltet, indem es die SC-Proliferation vorantreibt.<sup>121,122</sup> Darüber hinaus besitzt dieser Faktor eine starke angiogenetische Wirkung, er ist also an der Bildung neuer Gefäße beteiligt.<sup>120,123</sup> *In vitro* wurde in mehreren Studien gezeigt, dass exogen verabreichtes FGF-2 das Überleben von ZNS-Neuronen in Kulturen sowie die Bildung neuer Fortsätze aus diesen fördert.<sup>124,125</sup> In einer neueren Studie wurde außerdem beobachtet, dass FGF-2 unselektiv die Neubildung sowohl von sensiblen als auch von motorischen axonalen Fortsätzen *in vitro* fördert. Bei motorischen Fortsätzen zeigte sich jedoch eine dosisabhängige Wirkung. Dabei zeigten nur höhere Dosierungen (250 und 500 ng/ml) einen signifikanten Unterschied zu der Kontrollgruppe, während dieser bei niedrigen Dosierungen (25 und 50 ng/ml) ausblieb.<sup>126</sup> Auch *in vivo* Untersuchungen zeigten ähnliche Ergebnisse. Die exogene Zufuhr von FGF-2 an durchtrennten Neuronen des *N. is-*

*chiadicus* führte dazu, dass weniger sensible Neuronen im Spinalganglion läsionsbedingt abstarben.<sup>127</sup> Die regenerierten Axone aus dem proximalen Stumpf des *N. saphenus* waren außerdem bei Gabe von FGF-2 im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant länger.<sup>128</sup>

Zügig nach einer Nervendurchtrennung oder -quetschung (meistens innerhalb von einem Tag) wird die FGF-2 mRNA im proximalen und distalen Stumpf sowie im Spinalganglion hochreguliert.<sup>60,129,130</sup> Das FGF-2 Protein steigt sieben Tage nach einer Nervenquetschung ebenfalls in allen drei Bereichen. Im Gegensatz dazu kommt es zum gleichen Zeitpunkt nach einer Nervendurchtrennung zu einem Anstieg des Proteins lediglich im Spinalganglion und im proximalen Stumpf, während im distalen Stumpf kein Protein nachweisbar ist.<sup>130</sup> Darüber hinaus wird nach einer Läsion die FGF-2 mRNA nicht nur in SCs und Gefäßendothelzellen hochreguliert (s. o.), sondern zusätzlich auch in Makrophagen. Es wäre denkbar, dass das aus Makrophagen stammende FGF-2 möglicherweise an mehreren Prozessen beteiligt ist, wie beispielsweise der Neovaskularisation während der postläsionalen Nervenreparatur. Es könnte außerdem auto- oder parakrin wirken, da auch die Makrophagen selbst FGF-Rezeptoren besitzen.<sup>118</sup>

## 2.9. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die Qualität der Reinnervation der Schnurrhaarmuskulatur und das Ausmaß der Wiederherstellung der Vibrissenfunktion nach chirurgischer Rekonstruktion (Durchtrennung und Reanastomosierung) des *N. facialis* und Therapie mit neurotrophen Faktoren zu untersuchen und zu beurteilen.

Diese Arbeit basiert auf den Erkenntnissen, die aus drei vorherigen Studien unseres Arbeitskreises gewonnen wurden. TOMOV ET AL. (2002) verglichen zunächst mithilfe videobasierter Bewegungsanalyse die Wiederherstellung der Schnurrhaarfunktion nach Durchtrennung und Reanastomosierung des *N. facialis* in zwei Gruppen von Ratten: Einerseits die normalsichtigen Ratten der Zuchtlinie *Sprague-Dawley (SD)* und andererseits die blinden Ratten der Zuchtlinie *Sprague-Dawley/Royal College of Surgeons (SD/RCS)*. Dabei zeigten sie, dass zwei Monate nach der Operation bei den blinden *SD/RCS*-Ratten eine perfekte Wiederherstellung der Schnurrhaarfunktion erreicht wurde. Im Gegensatz dazu waren zum gleichen Zeitpunkt die Schnurrhaarbewegungen bei den normalsichtigen *SD*-Ratten signifikant beeinträchtigt. Überraschend war jedoch, dass die morphologischen und anatomischen Verhältnisse bei beiden Gruppen ähnlich waren: Es wurde bei beiden Gruppen ausgeprägtes axonales Branching sowie eine inakkurate Reinnervation der Target-Muskulatur beobachtet, da weniger als 40 % der Neuronen postoperativ ihr ursprüngliches Ziel reinnervierten.<sup>131</sup>

Die Literatur wies zu dem Zeitpunkt darauf hin, dass ein wichtiger Einflussfaktor auf die misslungene Reinnervation bzw. Funktionswiederherstellung nach einer Nervenläsion das axonale

kollaterale Branching sei. Darauf basierend sowie auf der Beobachtung, dass die blinden Ratten eine perfekte Wiederherstellung der Schnurrhaarfunktion zeigten, nutzten GUNTINAS-LICHIUS ET AL. (2005) NF-neutralisierende Antikörper, um das kollaterale axonale Branching im proximalen Stumpf zu reduzieren. Dies wurde auch erreicht, bei der Bewegungsanalyse stellte sich jedoch heraus, dass die Funktion der Schnurrhaarmuskulatur trotz der starken Reduktion des axonalen Branching – ähnlich wie bei der Kontrollgruppe – unzureichend blieb. Daher stellten sie die Hypothese auf, dass nicht das axonale Branching im proximalen Stumpf, sondern eher die Polyinnervation der NMJs für die schlechte Funktionswiederherstellung verantwortlich sein muss. Tatsächlich fanden sie dabei heraus, dass bei den blinden *SD/RCS*-Ratten lediglich 10 % der NMJs polyinnerviert waren; im Gegensatz dazu lag der Anteil dieser bei den normalsichtigen *SD*-Ratten bei 51 %.<sup>74</sup> Diese Ergebnisse unterstützten die Hypothese und gaben somit den Anlass für das darauf aufbauende Experiment von GROSHOVA ET AL. (2016).

In diesem Experiment wurde die mRNA- und Proteinmenge von verschiedenen NFs in dem Target-Muskel in den zwei oben genannten Rattenzuchtlinien untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass in den *SD/RCS*-Ratten die Menge der BDNF mRNA ab dem zweiten Tag postoperativ signifikant anstieg; diesem folgte ein verspäteter Anstieg des BDNF-Proteins nach dem 14. Tag, der sich am 28. Tag signifikant von den normalsichtigen Ratten unterschied. Gleichzeitig kam es innerhalb von zwei Tagen postoperativ zu einem starken Abfall der FGF-2 mRNA-Menge bei den normalsichtigen Ratten, die bis zum Ende der Untersuchung (28. Tag) konstant niedrig blieb. Im Gegensatz dazu blieb die FGF-2 mRNA-Menge bei den blinden Ratten – trotz eines geringen Abfalls, der erst zum Ende des Messzeitraums signifikant geworden ist – nahezu konstant. Über den gesamten postoperativen Untersuchungszeitraum hinweg blieb sie dabei signifikant höher als bei den normalsichtigen Ratten. Auch die FGF-2-Proteinkonzentration war bei den blinden Ratten sowohl prä- als auch am 2. Tag postoperativ signifikant höher als bei den Normalsichtigen. Bei Letzteren gab es lediglich einen leichten, jedoch signifikanten Anstieg des FGF-2-Proteins am 7. postoperativen Tag. Durch diesen Anstieg und die konstant bleibende Proteinkonzentration bei den blinden Ratten gab es ab dem 7. Tag postoperativ keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den Gruppen.<sup>132</sup>

Die vorliegende Studie ist eine Weiterführung der oben genannten Experimente. Zusammenfassend zeigte sich bei blinden *SD/RCS*-Ratten eine deutlich bessere postoperative Wiederherstellung der Vibrissenfunktion, die mit einer verminderten Polyinnervation der NMJs zusammenzuhängen schien.<sup>74,131</sup> Es wurde außerdem beobachtet, dass bestimmte NFs – unter anderem BDNF und FGF-2 – ein anderes Verhalten bzw. eine andere Dynamik bei den blinden im Vergleich zu den normalsichtigen Ratten zeigten, was möglicherweise auch mit der verbesserten Reinnervation zusammenhängen könnte. Denn bei den blinden Ratten wurde bereits

präoperativ eine erhöhte FGF-2 Proteinmenge, die postoperativ konstant blieb, sowie ein späterer Anstieg der BDNF-Proteinmenge festgestellt.<sup>132</sup>

In diesem Rahmen führten wir nach Durchtrennung und Reanastomosierung des *R. buccalis* (Ast des *N. facialis*, s. Abschnitt 2.3.3) intramuskuläre Injektionen von BDNF, dessen neutralisierenden Antikörper (anti-BDNF) sowie FGF-2 im *M. nasolabialis* in verschiedenen Dosierungen und Kombinationen zu verschiedenen Zeitpunkten durch. Unser Ziel war, die Qualität der Reinnervation der NMJs sowie das Ausmaß der Funktionswiederherstellung der Vibrissen nach dieser Therapie mit NFs zu untersuchen und zu beurteilen.

Durch das bessere Verständnis der Wirkungsweise der NFs erhoffen wir künftig entsprechende Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, die für bessere funktionelle Ergebnisse nach einer peripheren Nervenläsion sorgen könnten.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Tiere**

Für dieses Experiment wurden sechzig Wistar-Ratten (Janvier Labs, Zuchtlinie: RjHan:WI) im Alter von drei Monaten und mit einem Gewicht von 200–250 g herangezogen. Während der Gesamtdauer des Versuchs bekamen sie Standardfuttermittel (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und hatten Zugang zu Leitungswasser *ad libitum*. Es wurde ein künstlicher Licht-Dunkel-Zyklus mit jeweils zwölf Stunden Licht und Dunkelheit etabliert. Alle Versuchsprotokolle wurden von dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Az.81-02.04.2016.A217 vom 28.09.2016 und Az. 81-02.04.2021.A101 vom 13.07.2021) genehmigt und nach den Richtlinien der Europäischen Union durchgeführt.

#### **3.2. Operation (BBA – Buccalis-Buccalis-Anastomose)**

Die Operationen an den Versuchstieren wurden von Frau Prof. Dr. med. Maria Grosheva und Frau Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Svenja Rink-Notzon durchgeführt.

Nach einer intraperitonealen Injektion (200 µL) von Ketamin (120 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (20 mg/kg Körpergewicht) zur Anästhesie wurde der *R. buccalis* des *N. facialis* auf der rechten Seite freigelegt und durchtrennt. Anschließend wurden die beiden durchtrennten Enden mit zwei 11-0 atraumatischen Nähten (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) mikrochirurgisch reanastomosiert (Buccalis-Buccalis-Anastomose, BBA; s. Abbildung 6).

Der *R. marginalis mandibulae* des *N. facialis* wurde ebenfalls durchtrennt und sein proximaler Stumpf ligiert (s. Abbildung 6). Dies diente dazu, die Innervation der Muskelfasern des *M. nasolabialis* durch Axone dieses Fazialisastes zu verhindern. Denn die Schnurrhaarmuskulatur wird – wie bereits im Abschnitt 2.3.3 erklärt – von Neuronen beider Äste versorgt. Dabei reicht einer der Äste, um die physiologische Funktion aufrechtzuerhalten.<sup>25,26</sup> Durch die Durchtrennung des *R. marginalis mandibulae* konnte somit der Einfluss der exogenen NF-Gabe nach BBA auf die Regeneration an einer einzelnen Untergruppe von Axonen beurteilt werden.

#### **3.3. Postoperative Injektionen von BDNF, FGF-2 und anti-BDNF**

Die sechzig Ratten wurden in zehn Gruppen mit jeweils sechs Tieren unterteilt. Postoperativ erhielten sie zu verschiedenen Zeitpunkten und in verschiedenen Dosierungen subkutane Injektionen mit Placebo, NFs (BDNF, FGF-2) und/oder BDNF-neutralisierenden Antikörpern (anti-BDNF). Die postoperativen Injektionen wurden von Herrn Prof. Dr. med. Doychin N. Angelov durchgeführt.

Es wurden drei postoperative Zeitspannen für die Gaben festgelegt:

1. ‚Früh‘ – 1–13 Tage nach der BBA
2. ‚Spät‘ – 14–28 Tage nach der BBA sowie
3. ‚Durchgehend‘ – 1–28 Tage nach der BBA.

Für die kurzzeitige Narkose zum Zweck der Injektion wurde ein Gasgemisch aus 0,6 L/min Sauerstoff (Conoxia<sup>®</sup>, Linde) und Isofluran (Forene<sup>®</sup> 1,8 % vol, Abbott) verabreicht. Die Injektionen wurden an der gleichen Stelle in der Mitte zwischen den Schnurrhaarreihen A und B (s. Abbildung 1) mithilfe einer BD Micro-Fine™ Insulinspritze (U-100 [0,3 ml], Ø 0,3 mm [30G], Nadellänge 8,0 mm; Becton Dickinson, Produkt-Nr.: 324826) durchgeführt. Dabei wurde jeweils eine 30 µL Lösung gegeben, die Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; engl. *Phosphate-buffered saline*) als Placebo, BDNF (PeproTech<sup>®</sup>, Katalognummer: 450-02), anti-BDNF (PeproTech<sup>®</sup>, Katalognummer: 500-P84Bt) oder FGF-2 (PeproTech<sup>®</sup>, Katalognummer: 100-18C) allein oder in Kombinationen enthielt. Die verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

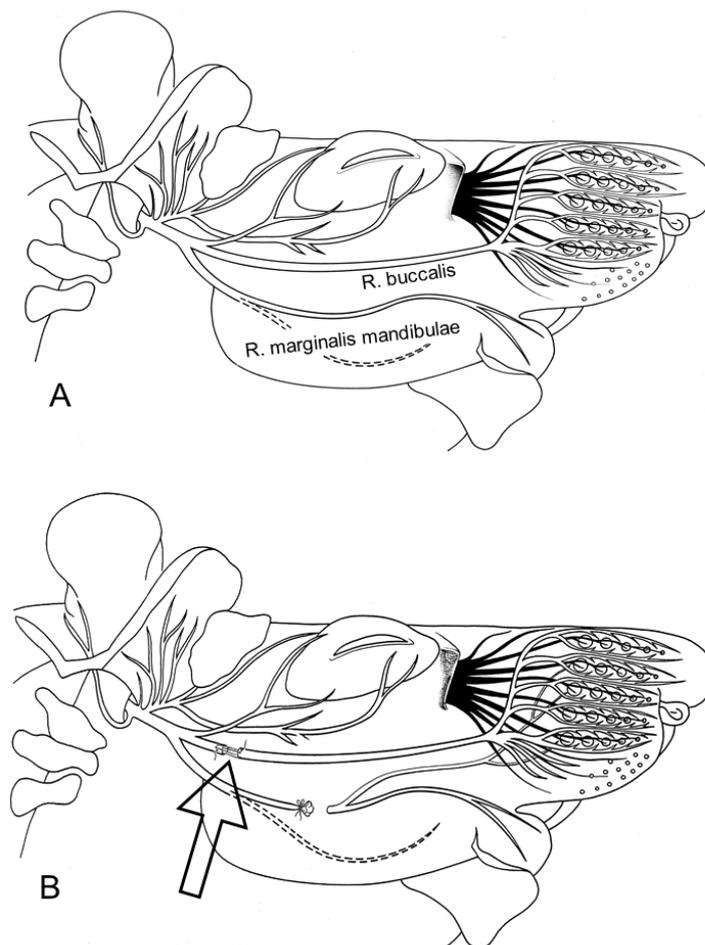


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Buccalis-Buccalis-Anastomose. **(A)** Physiologischer, präoperativer Zustand. **(B)** Nach Durchtrennung des *Ramus (R.) buccalis* erfolgte seine Reanastomosierung (Pfeil). Der *R. marginalis mandibulae* wurde ebenfalls durchtrennt und sein proximaler Stumpf ligiert, um die Versorgung der Schnurrhaarmuskulatur durch diesen Ast zu verhindern. Verwendung mit Genehmigung von Wiley. © 2020 Wiley Periodicals, Inc.

Tabelle 1: Versuchsaufbau mit Übersicht der Tiergruppen, der Substanzkonzentrationen sowie -kombinationen und der Zeitspanne der Injektionen. BBA, Buccalis-Buccalis-Anastomose; PBS, Phosphate-buffered saline; BDNF, Brain-derived neurotrophic factor; FGF-2, Fibroblast growth factor 2.

Tiergruppe	Verabreichte Substanz und Zeitspanne der Gabe (nach der BBA)	Konzentration der injizierten Substanz	Zeitspanne der Injektionen (Tage nach BBA)
1	Placebo (PBS) durchgehend	0.1 M	1–28
2	Niedrigdosiertes BDNF spät	50 ng/ml	14–28
3	Mitteldosiertes BDNF spät	1 µg/ml	14–28
4	Niedrigdosiertes anti-BDNF früh + Mitteldosiertes BDNF spät	2 µg/ml 1 µg/ml	1–13 14–28
5	Hochdosiertes anti-BDNF früh + Hochdosiertes BDNF spät	5 µg/ml 10 µg/ml	1–13 14–28
6	Niedrigdosiertes anti-BDNF früh	2 µg/ml	1–13
7	Niedrigdosiertes FGF-2 durchgehend	500 ng/ml	1–28
8	Niedrigdosiertes FGF-2 früh + Niedrigdosiertes BDNF spät	500 ng/ml 50 ng/ml	1–13 14–28
9	Hochdosiertes anti-BDNF früh + Hochdosiertes FGF-2 durchgehend	5 µg/ml 10 µg/ml	1–13 1–28
10	Hochdosiertes FGF-2 durchgehend	10 µg/ml	1–28

### 3.4. Videobasierte Bewegungsanalyse (VBMA) der Vibrissen während aktiver Exploration

Zur Beurteilung der postoperativen Funktionswiederherstellung der Vibrissen nach exogener Gabe von NFs wurden die Ratten sowohl prä- als auch postoperativ 28 sowie 56 Tage nach der BBA bei der aktiven Exploration aufgenommen. Wir entschieden uns für zwei postoperative Aufnahme- und somit Messzeitpunkte, da die Funktionswiederherstellung nach einer Nervendurchtrennung ein sehr komplexer, dynamischer Prozess ist, der nicht durch eine einzige Messung am Ende des Beobachtungszeitraums gut zu erfassen und beurteilen wäre. Dabei entsprechen die Daten, die am 28. Tag erhoben wurden, dem Zwischenergebnis, und diejenigen, die am 56. Tag erhoben wurden, dem Endergebnis einer exogenen Gabe von NFs über

diesen Zeitraum. Im Anschluss an die Aufnahmen erfolgte die – bereits durch mehrere Versuchsreihen in unserem Arbeitskreis etablierte – videobasierte Bewegungsanalyse (VBMA, *engl. für video-based motion analysis*) anhand dieser Videoaufzeichnungen.<sup>131,133,134</sup>

Für die VBMA war die Aufnahme und Auswertung der Bewegungen (Pro- und Retraktion) von zwei großen Vibrissen der Schnurrhaarreihe C (s. Abschnitt 2.3.1) auf beiden Kopfseiten notwendig. Alle anderen Vibrissen wurden am jeweiligen Tag vor den Videoaufnahmen nach kurzer Inhalationsnarkose – wie in Abschnitt 3.3 beschrieben – mit einer feinen chirurgischen Schere kurz geschnitten.

Die Ratten wurden am darauffolgenden Tag während der aktiven Exploration 3–5 Minuten lang mit einem digitalen Camcorder (Panasonic SDR-H60; Auflösung 640×360) aufgenommen. Die Entfernung der für das Experiment nicht benötigten Vibrissen sowie die Videoaufnahmen von den Versuchstieren während der aktiven Exploration wurden im Team mit Frau Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Svenja Rink-Notzon, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Habib Bendella, Frau Luisa Elles (M.Sc.) und mir selbst unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Doychin N. Angelov durchgeführt.

Die Videoaufnahmen wurden im Anschluss von mir selbst überprüft und 1,5-Sekunden-Sequenzen anhand festgelegter Kriterien gewählt. Zunächst sollte der Kopf möglichst wenig bewegt werden, sodass die auszuwertenden Bilder (s. u.) möglichst scharf sind. Darüber hinaus wurden sowohl die Whisking-Frequenz als auch das Ausmaß an Pro- und Retraktion (Merkmal der aktiven Exploration) berücksichtigt.

Diese Sequenzen wurden daraufhin mithilfe der für Bewegungsanalyse spezialisierten Software *Peak Motus 2000* (Peak Performance Technologies, Inc., USA) in Einzelbilder umgewandelt. Auf jedem Einzelbild wurden schließlich (nach entsprechender Anleitung durch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Habib Bendella) von mir manuell Punkte gesetzt, die für die Berechnung der verschiedenen Parameter (s. u.) notwendig waren. Somit entstand ein zweidimensionales räumliches Modell, das aus insgesamt elf Punkten bestand. Drei davon galten als Referenzpunkte: ein Punkt auf der Nasenspitze sowie jeweils einer an den beiden medialen Augenwinkeln. Zwischen den beiden Augenwinkeln wurde eine Hilfslinie gezogen, um die senkrecht zu dieser liegende medial-sagittale Linie zu bestimmen. Letztere verlief durch den Punkt auf der Nasenspitze. Die übrigen Punkte dienten zur Messung der Vibrissenbewegungen; dafür wurden zwei Punkte auf jeder Vibrisse gesetzt, einer an dem Vibrissenansatz und einer 0,5 cm distal davon auf dem Haarschaft. Die durch diese zwei Punkte entstandene Linie entspricht der Ausrichtung des Schnurrhaares (s. Abbildung 7).

Anhand der Position dieser Punkte wurden schließlich von der Software folgende fünf Parameter berechnet:

- Die Whisking-Frequenz, definiert als die Anzahl der Zyklen von Pro- und Retraktion pro Sekunde,
- der Winkel der maximalen Protraktion, definiert als der nach rostral offene Winkel zwischen der Ausrichtung des Haarschafts und der medial-sagittalen Linie (in Grad),
- die Whisking-Amplitude, definiert als die Differenz zwischen maximaler Pro- und Retraktion (in Grad),
- die Winkelgeschwindigkeit während der Protraktion (in Grad/Sekunde) sowie
- die Winkelbeschleunigung während der Protraktion (in Grad/Quadratsekunde).

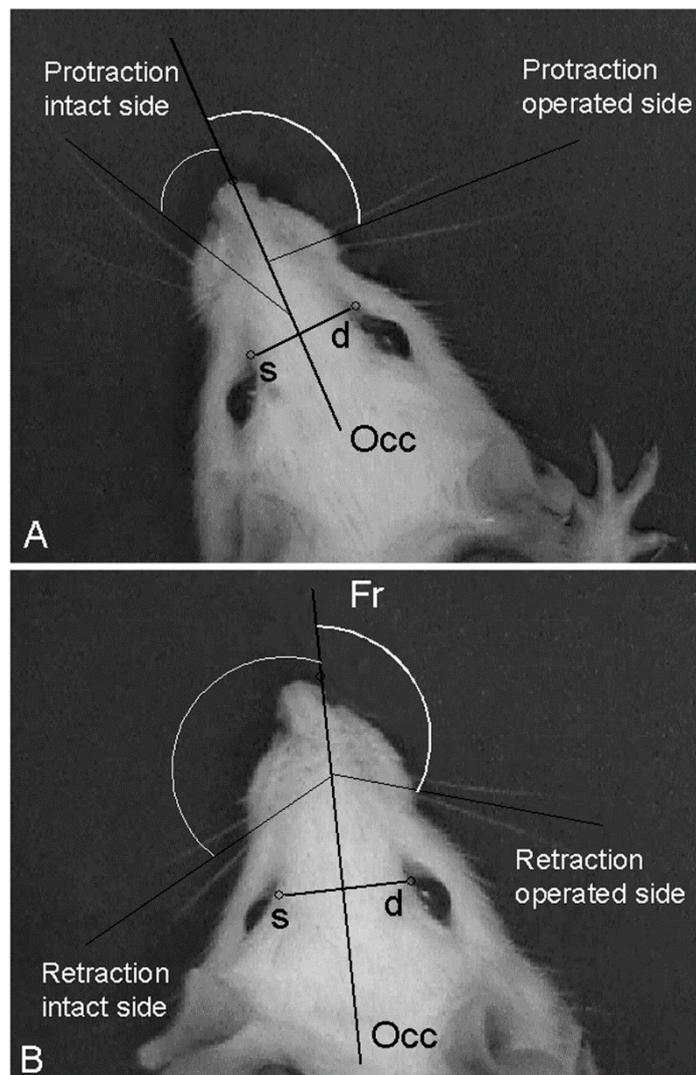


Abbildung 7: Videobasierte Bewegungsanalyse der Vibrissen während der Protraktion (**A**) und Retraktion (**B**). Die Punkte **s** und **d** markieren die beiden medialen Augenwinkel. Die Hilfslinie **s-d** dient der Bestimmung der senkrecht zu dieser liegenden medial-sagittalen Linie **Fr-Occ**, die durch die Nasenspitze verläuft. Auf der gesunden linken Seite lässt sich – im Gegensatz zu der operierten rechten Seite – ein großer Unterschied zwischen dem Winkel bei Pro- und Retraktion beobachten. Verwendung mit Genehmigung von Wiley. © 2020 Wiley Periodicals, Inc.

### 3.5. Gewebeaufbereitung für die neuromuskuläre Immunzytochemie

Anschließend an die Videoaufnahmen am 56. Tag nach der BBA wurden alle Ratten mit Isofluran tief narkotisiert und ihr Gefäßsystem mittels transkardialer Perfusion mit PBS (pH 7,4) ausgespült. Anschließend wurden ihre Gewebe durch Perfusion mit 4%igem Paraformaldehyd im gleichen Puffer fixiert. Die transkardiale Perfusion und Fixierung der Tiere sowie das Herauspräparieren der zu untersuchenden Muskeln (s. u.) wurden von Herrn Prof. Dr. med. Doychin N. Angelov durchgeführt.

Der *M. nasolabialis* – als größter Muskel und somit Hauptvertreter der Schnurrhaarmuskulatur – sowohl der intakten als auch der operierten Gesichtsseite wurde unter dem Operationsmikroskop herauspräpariert und in einer Saccharoselösung kryoprotectiert. Daraufhin wurde der Muskel mit dem Kryostaten in 30 µM-dicken Längsschnitten geschnitten; dabei entstanden circa 32–37 Schnitte pro Muskel.

Nach dem *Fraktionierprinzip* (engl. *fractionator principle*) wurde jeder dritte Schnitt gewählt und nach dem folgenden Protokoll immungefärbt.<sup>135</sup>

#### 3.5.1. Immunozytochemisches Protokoll

Zur Immunfärbung der Kryostatschnitte und somit Visualisierung der intramuskulären Axone wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen die unten aufgeführten Schritte durchlaufen. Kürzere Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur und Längere im Kühlschrank bei 4 °C durchgeführt.

Die Gewebeaufbereitung, immun- und histochemische Färbung sowie Fluoreszenzmikroskopie (s. u.) wurden von der technischen Assistentin Frau Luisa Elles (M.Sc.) durchgeführt.

##### Tag 1

- a. Trocknen der Schnitte im Trockenschrank für 30 Minuten bei 37 °C.
- b. Zweimalige, jeweils fünfminütige Spülung in PBS.
- c. Inkubation in 5%igem Normalem Schafserum, 0,2%igem Triton™ X-100 und 0,02%igem Natriumazid in PBS für eine Stunde.
- d. Inkubation in dem aus Kaninchen stammenden polyklonalen Antikörper gegen das neuronale Klasse-III-β-Tubulin (Covance [inzwischen BioLegend, Inc.], Katalognummer PRB-435P; Verdünnung 1:1000), 0,5%igem λ-Carrageen und 0,02%igem Natriumazid in PBS über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C.

## Tag 2 und 3

- a. Dreimalige, jeweils 15-minütige Spülung der Schnitte in PBS.
- b. Inkubation in dem aus Schafen stammenden und an den roten Fluoreszenzfarbstoff Cy3 konjugierten Anti-Kaninchen-IgG (Sigma-Aldrich®, Produktnummer C2306; Verdünnung 1:200), 0,5%igem  $\lambda$ -Carrageen und 0,02%igem Natriumazid in PBS für zwei Stunden im Kühlschrank bei 4 °C.
- c. Erneute dreimalige, jeweils 15-minütige Spülung der Schnitte in PBS.
- d. Inkubation in dem aus Schlangen gewonnenen und an den grünen Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 konjugierten  $\alpha$ -Bungarotoxin (Molecular Probes [inzwischen Thermo Fisher Scientific], Katalognummer: B13422; Verdünnung 1:130) für zwei Stunden bei 4 °C.
- e. Zweimalige, jeweils 10-minütige Spülung in PBS.
- f. 10-minütige Spülung in destilliertem Wasser.
- g. Trocknen der Schnitte im Trockenschrank für 30 Minuten bei 37 °C.
- h. Eindecken der Schnitte mit Fluoromount-G™ und Trocknen dieser über Nacht.
- i. Entfernung von Fluoromount-G™-Resten und Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank.

### 3.5.2. Fluoreszenzmikroskopie und Beurteilung der NMJs

Die Beurteilung der NMJs mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie erfolgte anhand des etablierten Schemas aus früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe.<sup>74</sup> Die Kryostatschnitte wurden bei einer Vergrößerung von 400x unter dem Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop 50, Carl Zeiss AG) betrachtet. Hierfür wurden der ‚Rhodamin‘-Filtersatz (Carl Zeiss Filtersatz 15, Anregung BP 546/12, Strahlteiler FT 580, Emission LP 590) und der ‚Fluorescein‘-Filtersatz (Carl Zeiss Filtersatz 09, Anregung BP 450–490, Strahlteiler FT 510, Emission LP 515) verwendet.

Die Beurteilung der Qualität der Reinnervation der NMJs erfolgte anhand der Anzahl der axonalen Fortsätze (rot-orangefarben; identifiziert durch die Immunfärbung von  $\beta$ -Tubulin), die in die Grenzen einer NMJ (grünfarben; identifiziert durch die histochemische Färbung von Acetylcholinrezeptoren) eintreten oder diese möglicherweise verlassen. Es wurden alle NMJs beurteilt mit Ausnahme solcher, die auf den Oberflächen des Schnittes abgeschnitten zu sein schienen. Zunächst wurden die NMJs anhand der grünen Farbe identifiziert und anschließend wurde durch Fokussierung in der Schnitttiefe die Anzahl der mit dieser assoziierten Axone bestimmt.<sup>74</sup> Dabei entstanden drei Gruppen von NMJs:

- a) Monoinnervierte NMJs: Es konnte lediglich ein Axon beobachtet werden. Als Monoinnervation gilt auch der Fall, bei dem verschiedene NMJs von terminalen Ästen des gleichen Motoneurons jeweils monoinnerviert werden (s. Abschnitt 2.4.3, Abbildung 8A),

- b) Polyinnervierte NMJs: Es konnten mindestens zwei Axone beobachtet werden (s. Abbildung 8B).
- c) Denervierte NMJs: Es konnte kein Axon beobachtet werden.

Der Anteil der zu jeder der oben genannten Gruppen gehörenden NMJs an der Gesamt-NMJ-Population wurde in Prozent angegeben und wird näher im Abschnitt 4.2 behandelt.

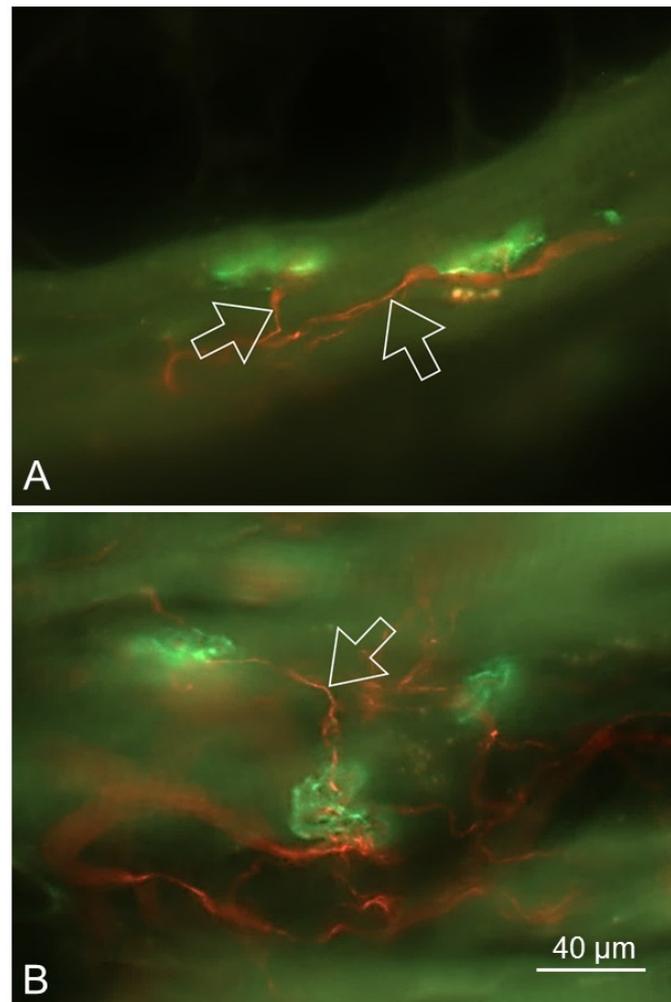


Abbildung 8: Beurteilung des Reinnervationsmusters der neuromuskulären Endplatten (NMJs) mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie. Die axonalen Fortsätze werden in Orange-Rot und die NMJs in Grün dargestellt. Das Bild **A** zeigt zwei NMJs, die von den terminalen Ästen (Pfeile) des gleichen Motoneurons jeweils monoinnerviert werden (Bild aus einer intakten Ratte). Im Gegensatz dazu ist die unten-mittig im Bild **B** abgebildete NMJ polyinnerviert, da sie durch zwei axonale Fortsätze reinnerviert wird. Einer davon, der aus der benachbarten oben-links liegenden NMJ stammt (Pfeil), gehört zu den sogenannten *escaped fibers*. Verwendung mit Genehmigung von Wiley. © 2020 Wiley Periodicals, Inc.

### 3.6. Statistische Evaluation

Die statistische Evaluation der erhobenen Messwerte wurde von Herrn Prof. Dr. Levent Sarikcioğlu mithilfe der Programmiersprache R (Version R 3.6.1) durchgeführt.<sup>136</sup>

Für die parametrische statistische Testung wurde die lineare Regression (lineare Modelle) mit Dummy-kodierten kategorialen Variablen verwendet. Dieses Verfahren entspricht einer Varianzanalyse (ANOVA; engl. *Analysis of Variance*) für unbalancierte Daten. Anschließend folgte der multiple Vergleich zwischen den Gruppen mithilfe des *Tukey-HSD-Tests* (engl. *Tukey's honestly significant difference test*). Um die Verständlichkeit der Daten zu fördern, wurden die Ergebnisse der ANOVA als der F-Wert an den entsprechenden Freiheitsgraden angegeben. Zur Verbesserung der Lesbarkeit wurden die Zahlen außerdem auf eine signifikante Stelle nach dem Komma aufgerundet. Die Wahrscheinlichkeiten für Fehler 1. Art (p-Wert) wurden kleiner als das nächstliegende klassischerweise akzeptierte Signifikanzniveau (z. B.  $p < 0,01$  oder  $p < 0,0001$ ) angegeben.

Es erfolgte einerseits die Auswertung der Daten, die jeweils am 28. und 56. Tag nach der BBA durch die VBMA gewonnen wurden. Um zwischenzeitliche Veränderungen, die bei einem dermaßen komplexen und dynamischen Prozess wie der Funktionswiederherstellung üblich sind, sowie den zwischenzeitlichen Behandlungseffekt mit NFs zu erfassen, bestimmten wir außerdem die Amplitudendifferenz zwischen dem 28. und 56. Tag (s. Abschnitte 3.4 und 4.1.4).

Andererseits erfolgte auch die Auswertung der Daten, die aus dem Reinnervationsmuster der NMJs gewonnen wurden. Dabei wurden zunächst die Prozentsätze der reinnervierten (mono-innerviert und polyinnerviert) und denervierten NMJs bestimmt (s. Tabelle 4). In manchen Gruppen fiel dabei auf, dass keine nicht-innervierten (0 %) NMJs beobachtet wurden. Somit waren die Daten nicht normalverteilt. Aus diesem Grund wurde für die Auswertung dieser Daten die nicht-parametrische *Kruskal-Wallis-ANOVA* und im Anschluss die *Post-hoc-Analyse* mithilfe der *Holm-Korrektur* verwendet.

Nach Abschluss der separaten Auswertung der oben genannten Datensätze erfolgte schließlich die Suche nach einer Korrelation zwischen der Whisking-Amplitude und dem Reinnervationsmuster. Für diesen Zweck wurde die *Rangkorrelation nach Spearman* verwendet. Signifikante Korrelationen wurden daraufhin durch lineare Regression der Daten des Reinnervationsmusters (Prozentsatz der nicht- oder polyinnervierten NMJs) mit den Daten der Funktionswiederherstellung (Whisking-Amplitude am 56. postoperativen Tag sowie Amplitudendifferenz zwischen dem 28. und 56. postoperativen Tag) weiter untersucht.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Quantitative Auswertung der Ergebnisse der videobasierten Bewegungsanalyse der Vibrissen präoperativ und nach postoperativer Behandlung mit neurotrophen Faktoren**

#### **4.1.1. Präoperative Leistungsfähigkeit der Vibrissen in intakten Ratten**

In intakten Ratten bewegten sich die Vibrissen während der aktiven Exploration mit einer Whisking-Frequenz von ~6–7 Hz. Der Winkel der maximalen Protraktion betrug ~50° und die Whisking-Amplitude ~60°. Während der Protraktion betrug die Winkelgeschwindigkeit ~1.200°/s und die Winkelbeschleunigung ~40.000°/s<sup>2</sup> (s. erste Zeile in Tabelle 2 und Tabelle 3).

#### **4.1.2. Leistungsfähigkeit der Vibrissen am 28. postoperativen Tag: Kein signifikanter Effekt der Behandlung mit neurotrophen Faktoren**

Am 28. postoperativen Tag wurden in der mit Placebo behandelten Gruppe 1 statistisch signifikante – durch die Denervation induzierte – Defizite in allen Parametern außer der Whisking-Frequenz beobachtet (s. Tabelle 2, Gruppe 1). Dabei zeigte sich ein erhöhter Winkel der maximalen Protraktion (+109 % im Vergleich zu den intakten Ratten vor der BBA), eine verminderte Whisking-Amplitude (–75 % vs. intakte Ratten) sowie verminderte Winkelgeschwindigkeit und -beschleunigung (entsprechend –81 % und –65 % vs. intakte Ratten).

In den weiteren Gruppen (s. Tabelle 2, Gruppen 2–10) konnten die oben genannten Defizite ebenfalls beobachtet werden. Es zeigte sich zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Effekt durch die Therapie mit den entsprechenden Kombinationen von NFs oder deren Antikörper (s. Abbildung 9).

#### **4.1.3. Leistungsfähigkeit der Vibrissen am 56. postoperativen Tag: Signifikante Verbesserung der Whisking-Amplitude durch Gabe von anti-BDNF, FGF-2 oder deren Kombination**

Auch am 56. postoperativen Tag persistierten die starken funktionellen Defizite, die am 28. Tag beobachtet wurden. Im Vergleich zu der Placebogruppe zeigte sich jedoch ein signifikanter Anstieg der durchschnittlichen Whisking-Amplitude um ~10° in drei Gruppen (ANOVA  $F[9/50] = 7,6$ ;  $p < 0,0001$ ; s. Tabelle 3, Abbildung 9):

- a. Gruppe 6; in dieser erhielten die Ratten lediglich anti-BDNF 1–13 Tage nach der BBA ( $p < 0,05$ )

- b. Gruppe 9; in dieser erhielten die Ratten anti-BDNF 1–13 Tage nach der BBA in Kombination mit hochdosiertem FGF-2 durchgehend (1–28 Tage;  $p < 0,05$ ) und
- c. Gruppe 10; in dieser erhielten die Ratten lediglich hochdosiertes FGF-2 durchgehend (1–28 Tage;  $p < 0,05$ ).

#### **4.1.4. Vergleich der Leistungsfähigkeit der Vibrissen zwischen dem 28. und 56. Tag: Signifikante Besserung der Whisking-Amplitude durch Gabe von BDNF und FGF-2 allein oder in Kombination mit anti-BDNF**

Wie bereits im Abschnitt 3.4 angesprochen, ist die postoperative Funktionswiederherstellung der Vibrissen ein sehr dynamischer Prozess, der besser durch zwei Messungen – eine in der Mitte (28. Tag) und eine am Ende (56. Tag) des Beobachtungszeitraums – erfasst werden kann. Denn es wäre möglich, dass eine zunächst beobachtete gute Vibrissenfunktion durch verschiedene Faktoren (u. a. auch die Behandlungsstrategie mit den NFs) nicht aufrechterhalten oder sogar aufgehoben wird. Umgekehrt könnte auch eine zunächst unzureichende Vibrissenfunktion im Verlauf verbessert werden. Um solche Veränderungen sowie den zwischenzeitlichen Effekt einer Therapie mit NFs zu erfassen, bestimmten wir – zusätzlich zu der Auswertung der Vibrissenfunktion jeweils am 28. und 56. Tag – auch den Unterschied der Whisking-Amplitude (Amplitudendifferenz) zwischen dem 28. und 56. Tag und prüften dabei, ob sich dieser signifikant von Null unterschied.

Dabei zeigte sich, dass sich mindestens eine Gruppe signifikant von Null unterschied ( $F[10/50] = 3,5$ ;  $p = 0,001$ ). In insgesamt drei Gruppen konnte eine signifikante Besserung der Funktion nach exogener Gabe von NFs festgestellt werden (s. Tabelle 2 und Tabelle 3):

1. Gruppe 3; in dieser Gruppe erhielten die Ratten mitteldosiertes BDNF 14–28 Tage nach der BBA (Amplitudendifferenz = 9;  $p < 0,05$ )
2. Gruppe 9; in dieser erhielten die Ratten anti-BDNF 1–13 Tage nach der BBA in Kombination mit hochdosiertem FGF-2 über die gesamte Untersuchungsdauer durchgehend (Amplitudendifferenz = 13;  $p < 0,005$ )
3. Gruppe 10; in dieser erhielten die Ratten lediglich hochdosiertes FGF-2 durchgehend (Amplitudendifferenz = 9,33;  $p < 0,05$ ).

## **4.2. Auswertung der Qualität der Reinnervation**

Wie in Abschnitt 3.5.2 bereits erwähnt, wurde mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie zunächst die Anzahl der mono-, poly- oder nicht-innervierten NMJs bestimmt und ihr prozentualer Anteil an der Gesamt-NMJ-Population berechnet (s. Tabelle 4).

Die mittels ANOVA durchgeführte statistische Auswertung dieser Daten zeigte signifikante Effekte der Behandlung auf den Anteil polyinnervierter NMJs im reinnervierten *M. nasolabialis* ( $F[9/50] = 8,5$ ;  $p < 0,0001$ ). Im Anschluss durchgeführte multiple Vergleiche zeigten jedoch entgegen unseren Erwartungen, dass die Gruppen 6, 9 und 10 – die einen signifikanten Anstieg der Amplitude in der VBMA zeigten – *keinen* signifikant geringeren Anteil an polyinnervierten NMJs aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten die Gruppen 2, 7 und 8 – bei denen sich keine signifikante Verbesserung der Amplitude feststellen ließ – signifikant weniger polyinnervierte NMJs. In diesen drei Gruppen (2, 7, 8) zeigten sich darüber hinaus signifikant mehr nicht-innervierte NMJs: Dies ließ sich sowohl durch die *Kruskal-Wallis-ANOVA* feststellen ( $\chi^2 = 47,7$ ;  $df = 9$ ;  $p < 0,0001$ ) als auch durch die signifikanten Ergebnisse der *Post-hoc-Testung* mit entsprechend  $17,8 \pm 15,2 \%$  ( $p < 0,0001$ ),  $15,6 \pm 4,5 \%$  ( $p < 0,001$ ) und  $16,4 \pm 9,0 \%$  ( $p < 0,001$ ) bestätigen (s. Tabelle 4).

#### **4.3. Verhältnis zwischen der Whisking-Amplitude und dem prozentualen Anteil an nicht-innervierten NMJs**

Die Tiere in der Gruppe 9 (Behandlung mit anti-BDNF 1–13 Tage nach der BBA in Kombination mit hochdosiertem FGF-2 1–28 Tage durchgehend) zeigten am 56. Tag die größte Whisking-Amplitude – und somit die beste Funktionswiederherstellung der Vibrissen – bei gleichzeitig vollständiger Reinnervation, d. h. Fehlen von nicht-innervierten NMJs (s. Tabelle 3 und Tabelle 4). Auch die Gruppe 10 (Behandlung lediglich mit hochdosiertem FGF-2 1–28 Tage durchgehend) war durch das Fehlen von nicht-innervierten NMJs gekennzeichnet; in dieser war jedoch die Whisking-Amplitude signifikant geringer als in der Gruppe 9 (allerdings signifikant höher als in der Placebogruppe; s. Tabelle 3 und Tabelle 4).

Die zunächst durchgeführte *Rangkorrelation nach Spearman* zeigte eine schwache bis mittlere negative Korrelation zwischen der Whisking-Amplitude und dem Anteil an nicht-innervierten NMJs (*Spearman's*  $\rho = -0,39$ ;  $p < 0,01$ ). Dementsprechend lässt sich am 56. postoperativen Tag eine kleine, aber prädiktive Signifikanz zwischen den funktionellen und anatomischen Verhältnissen feststellen.

Im Anschluss erfolgte die Regressionsanalyse (lineare Regression) des prozentualen Anteils nicht-innervierter NMJs und der Whisking-Amplitude sowohl am 56. als auch zwischen dem 28. und 56. Tag nach der BBA (Amplitudendifferenz). Dabei zeigte sich einerseits, dass das Ausmaß der Denervation am 56. postoperativen Tag ein signifikanter Prädiktor für verminderte Whisking-Amplitude ( $F[1/58] = 6,136$ ;  $p < 0,05$ ) und verantwortlich für ca. 10 % der Varianz ist ( $R^2 = 0,096$ ). Denn die Regressionsanalyse sagte voraus, dass jeder Anstieg der nicht-innervierten NMJs um 1 % eine durchschnittliche Abnahme der Amplitude um  $0,25^\circ$  zur Folge hätte.

Andererseits ließ sich auch eine starke Korrelation der Amplitudendifferenz mit dem Anteil nicht-innervierter NMJs feststellen. Für einen Anstieg der nicht-innervierten NMJs um 1 % sagte das Modell eine durchschnittliche Abnahme der Amplitudendifferenz um  $0,58^\circ$  voraus ( $F[1/58] = 11,937$ ;  $p = 0,001$ ); dies wiederum verursacht  $\sim 17\%$  der Varianz ( $R^2 = 0,17$ ). Infolgedessen sagt die lineare Regression einen engeren Zusammenhang der Amplitudendifferenz – als der absoluten Whisking-Amplitude am 56. Tag nach der BBA – mit den morphologischen Änderungen im Muskel, d. h. der Reinnervation, vorher.

Tabelle 2: Ergebnisse der videobasierten Bewegungsanalyse in intakten Ratten vor der Buccalis-Buccalis-Anastomose (BBA) sowie am 28. Tag nach der BBA in Ratten, die entweder mit Placebo (Gruppe 1) oder mit Kombinationen von neurotrophen Faktoren bzw. deren neutralisierenden Antikörpern behandelt wurden (Gruppen 2–10). PBS, Phosphate-buffered saline; BDNF, Brain-derived neurotrophic factor; FGF-2, Fibroblast growth factor 2. ‚Früh‘ 1–13 Tage nach der BBA; ‚Spät‘ 14–28 Tage nach der BBA sowie ‚Durchgehend‘ 1–28 Tage nach der BBA.

Tiergruppe	Verabreichte Substanz und Zeitspanne der Gabe (nach der BBA)	Frequenz (in Hz)	Winkel der maximalen Protraktion (in Grad)	Amplitude (in Grad)	Winkelgeschwindigkeit während der Protraktion (in Grad/s)	Winkelbeschleunigung während der Protraktion (in Grad/s <sup>2</sup> )
Intakt (vor BBA)	–	7,2 ± 1,4	56 ± 13	65 ± 15	1.277 ± 695	42.174 ± 21.158
1	Placebo (PBS) durchgehend	6,5 ± 2,1	117 ± 10	16 ± 5	244 ± 133	14.800 ± 14.495
2	Niedrigdosiertes BDNF spät	8,0 ± 2,3	106 ± 22	26 ± 10	362 ± 151	29.200 ± 28.460
3	Mitteldosiertes BDNF spät	6,2 ± 1,5	117 ± 10	12 ± 5	155 ± 36	7.968 ± 5.617
4	Niedrigdosiertes anti-BDNF früh + Mitteldosiertes BDNF spät	6,0 ± 2,1	114 ± 13	15 ± 10	173 ± 90	9.668 ± 8.964
5	Hochdosiertes anti-BDNF früh + Hochdosiertes BDNF spät	8,8 ± 3,7	105 ± 10	15 ± 4	311 ± 189	17.618 ± 19.804
6	Niedrigdosiertes anti-BDNF früh	7,1 ± 1,3	107 ± 22	19 ± 16	314 ± 301	11.795 ± 8.964
7	Niedrigdosiertes FGF-2 durchgehend	6,5 ± 1,2	93 ± 17	28 ± 14	391 ± 266	15.794 ± 14.266
8	Niedrigdosiertes FGF-2 früh + Niedrigdosiertes BDNF spät	5,5 ± 1,6	95 ± 12	23 ± 9	329 ± 226	7.914 ± 5.326
9	Hochdosiertes anti-BDNF früh + Hochdosiertes FGF-2 durchgehend	8,3 ± 4,3	111 ± 12	18 ± 8	213 ± 114	12.893 ± 14.750
10	Hochdosiertes FGF-2 durchgehend	7,8 ± 2,3	110 ± 20	20 ± 10	308 ± 206	18.084 ± 15.418

Tabelle 3: Ergebnisse der videobasierten Bewegungsanalyse in intakten Ratten vor der Buccalis-Buccalis-Anastomose (BBA) sowie am 56. Tag nach der BBA in Ratten, die entweder mit Placebo (Gruppe 1) oder mit Kombinationen von neurotrophen Faktoren bzw. deren neutralisierenden Antikörpern behandelt wurden (Gruppen 2–10). Die Gruppendurchschnittswerte, die sich signifikant von der Placebogruppe 1 unterscheiden, werden mit einem Asterisk gekennzeichnet (jeweils  $p < 0,05$ ). PBS, Phosphate-buffered saline; BDNF, Brain-derived neurotrophic factor; FGF-2, Fibroblast growth factor 2. ‚Früh‘ 1–13 Tage nach der BBA; ‚Spät‘ 14–28 Tage nach der BBA sowie ‚Durchgehend‘ 1–28 Tage nach der BBA.

Tiergruppe	Verabreichte Substanz und Zeitspanne der Gabe (nach der BBA)	Frequenz (in Hz)	Winkel der maximalen Protraktion (in Grad)	Amplitude (in Grad)	Winkelgeschwindigkeit während der Protraktion (in Grad/s)	Winkelbeschleunigung während der Protraktion (in Grad/s <sup>2</sup> )
Intakt (vor BBA)	–	7,2 ± 1,4	56 ± 13	65 ± 15	1.277 ± 695	42.174 ± 21.158
1	Placebo (PBS) durchgehend	6,7 ± 1,5	107 ± 19	18 ± 4	368 ± 335	12.872 ± 11.592
2	Niedrigdosiertes BDNF spät	7,0 ± 1,8	105 ± 10	18 ± 3	274 ± 108	21.012 ± 24.529
3	Mitteldosiertes BDNF spät	5,7 ± 1,5	93 ± 22	21 ± 8	269 ± 121	9.065 ± 5.324
4	Niedrigdosiertes anti-BDNF früh + Mitteldosiertes BDNF spät	6,3 ± 1,0	98 ± 14	23 ± 4	367 ± 153	12.790 ± 3.460
5	Hochdosiertes anti-BDNF früh + Hochdosiertes BDNF spät	8,1 ± 5,8	101 ± 16	14 ± 4	374 ± 438	17.264 ± 24.176
6	Niedrigdosiertes anti-BDNF früh	6,5 ± 1,0	100 ± 12	28 ± 6 *	345 ± 148	14.926 ± 8.267
7	Niedrigdosiertes FGF-2 durchgehend	6,2 ± 1,5	91 ± 22	19 ± 7	286 ± 211	21.600 ± 33.673
8	Niedrigdosiertes FGF-2 früh + Niedrigdosiertes BDNF spät	7,1 ± 1,5	88 ± 25	18 ± 5	314 ± 262	20.500 ± 25.378
9	Hochdosiertes anti-BDNF früh + Hochdosiertes FGF-2 durchgehend	7,1 ± 1,3	91 ± 11	32 ± 3 *	358 ± 120	13.674 ± 6.083
10	Hochdosiertes FGF-2 durchgehend	6,7 ± 1,8	95 ± 9	29 ± 4 *	441 ± 166	16.963 ± 8.041

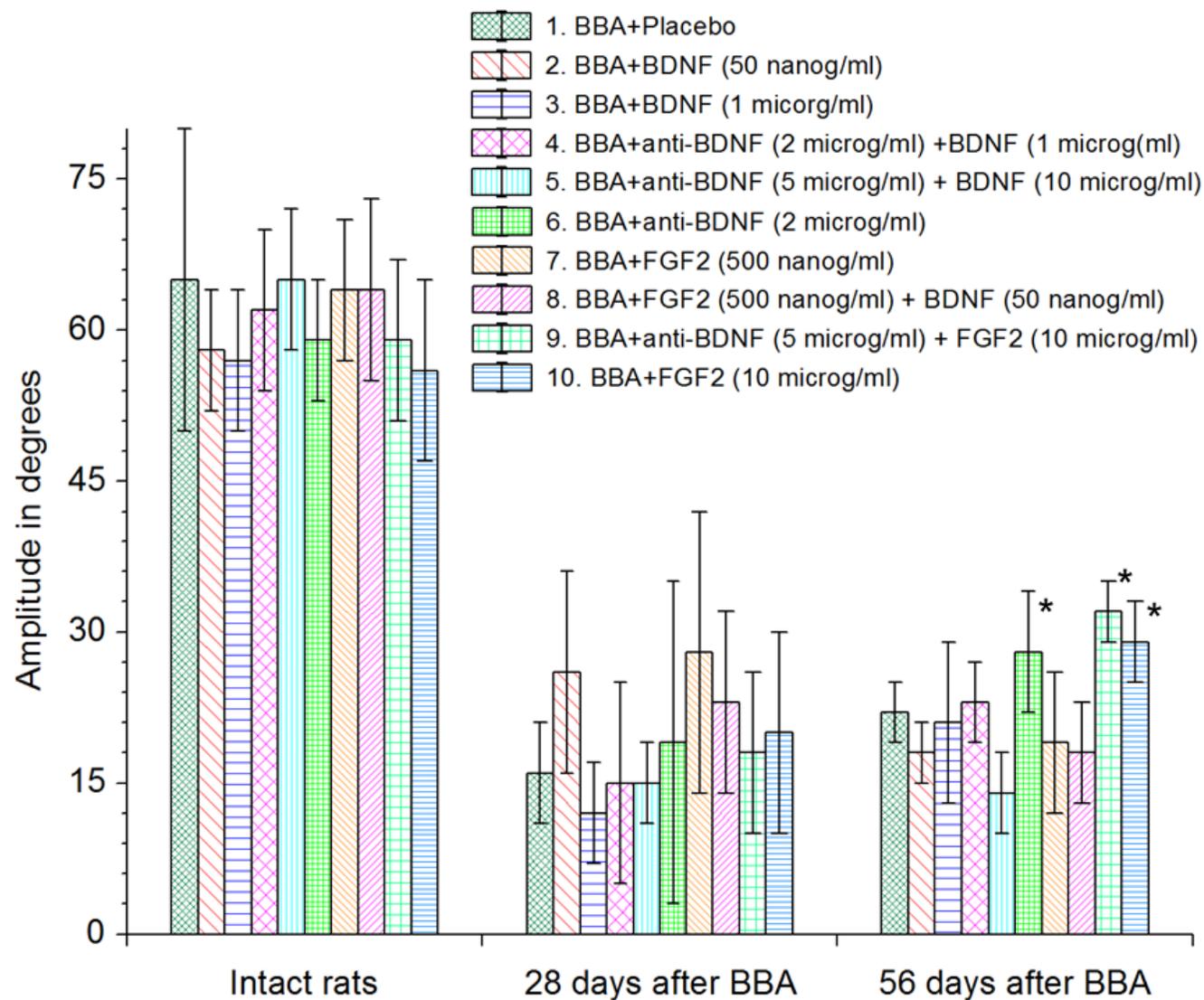


Abbildung 9: Durchschnittliche Whisking-Amplitude (in Grad; *Amplitude in degrees*;  $\pm$  Standardabweichung) in den verschiedenen Tiergruppen vor der Buccalis-Buccalis-Anastomose (BBA; *Rats before BBA, no treatment*) sowie am 28. und 56. postoperativen Tag (*28 bzw. 56 days after BBA*). Der – im Vergleich zu der Placebogruppe 1 – signifikante Anstieg der Amplitude am 56. Tag in den Gruppen 6, 9 und 10 wird mit einem Asterisk gekennzeichnet (jeweils  $p < 0,05$ ). BDNF, Brain-derived neurotrophic factor; FGF-2, Fibroblast growth factor 2. Verwendung mit Genehmigung von Wiley. © 2020 Wiley Periodicals, Inc. Färbung der Grafik durch Herrn Prof. Dr. med. Doychin N. Angelov.

Tabelle 4: Reinnervationsmuster des *Musculus nasolabialis* in intakten Ratten vor der Buccalis-Buccalis-Anastomose (BBA) sowie am 56. Tag nach der BBA in Ratten, die entweder mit Placebo (Gruppe 1) oder mit Kombinationen von neurotrophen Faktoren bzw. deren neutralisierenden Antikörpern behandelt wurden (Gruppen 2–10). Die Gruppendurchschnittswerte, die sich signifikant von der Placebogruppe 1 unterscheiden, werden mit einem Asterisk gekennzeichnet (jeweils  $p < 0,05$ ). PBS, Phosphate-buffered saline; BDNF, Brain-derived neurotrophic factor; FGF-2, Fibroblast growth factor 2. ‚Früh‘ 1–13 Tage nach der BBA; ‚Spät‘ 14–28 Tage nach der BBA sowie ‚Durchgehend‘ 1–28 Tage nach der BBA.

Tiergruppe	Verabreichte Substanz und Zeitspanne der Gabe (nach der BBA)	Neuromuskuläre Endplatten		
		Monoinnerviert (%)	Polyinnerviert (%)	Nicht-innerviert (%)
Intakt (vor BBA)	–	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
1	Placebo (PBS) durchgehend	15 ± 9	83 ± 10	2 ± 1,8
2	Niedrigdosiertes BDNF spät	26 ± 5	56 ± 15 *	18 ± 15 *
3	Mitteldosiertes BDNF spät	19 ± 12	80 ± 12	1 ± 0,9
4	Niedrigdosiertes anti-BDNF früh + Mitteldosiertes BDNF spät	29 ± 8	67 ± 11	4 ± 3,5
5	Hochdosiertes anti-BDNF früh + Hochdosiertes BDNF spät	14 ± 5	85 ± 6	1 ± 1
6	Niedrigdosiertes anti-BDNF früh	20 ± 4	77 ± 4	2 ± 1
7	Niedrigdosiertes FGF-2 durchgehend	31 ± 10	53 ± 8 *	16 ± 4 *
8	Niedrigdosiertes FGF-2 früh + Niedrigdosiertes BDNF spät	26 ± 13	58 ± 15 *	16 ± 9 *
9	Hochdosiertes anti-BDNF früh + Hochdosiertes FGF-2 durchgehend	30 ± 5	70 ± 5	0 ± 0
10	Hochdosiertes FGF-2 durchgehend	25 ± 5	75 ± 4	0 ± 0

## 5. Diskussion

In dieser Studie untersuchten wir den Einfluss der exogenen Gabe von NFs bzw. deren neutralisierenden Antikörpern auf die Funktionswiederherstellung der Vibrissen sowie das Reinnervationsmuster. Die NFs – in verschiedenen Dosierungen und Kombinationen – dienten somit als Behandlungsmöglichkeit nach einer operativen Durchtrennung und Reanastomosierung des *R. buccalis* (Ast des *N. facialis*).

Dabei zeigte die Auswertung der VBMA-Ergebnisse, dass sich am 28. postoperativen Tag kein signifikanter Behandlungseffekt feststellen ließ. Erst am 56. Tag nach der BBA konnte ein signifikanter Anstieg der Amplitude um ca. 10° beobachtet werden. Dies war der Fall in den Gruppen 6, 9 und 10, die niedrig- bzw. hochdosiertes anti-BDNF früh (Tag 1–13), hochdosiertes FGF-2 durchgehend (Tag 1–28) oder eine Kombination der beiden erhielten. Es wurde außerdem mithilfe der Amplitudendifferenz, die den zwischenzeitlichen Behandlungseffekt widerspiegeln sollte, geprüft, ob es im späteren Verlauf des Versuchs zu einer signifikanten Besserung der Vibrissenfunktion durch die Gabe von NFs kam. Dies war in den Gruppen 9 und 10 (s. o.) sowie in der Gruppe 3, in der die Tiere lediglich mitteldosiertes BDNF spät (Tag 14–28) bekamen, der Fall.

Bei der Auswertung des Reinnervationsmusters zeigten allerdings alle oben genannten Gruppen keinen signifikant geringeren Anteil an polyinnervierten NMJs. Dies ließ sich stattdessen in den Gruppen 2, 7 und 8 beobachten, die mit niedrigdosiertem BDNF spät (Tag 14–28), niedrigdosiertem FGF-2 früh oder durchgehend (Tag 1–13 oder 1–28) sowie deren Kombination behandelt wurden. In diesen Gruppen ließ sich jedoch keine signifikante funktionelle Besserung der Vibrissen in der VBMA feststellen. Außerdem zeigten diese Gruppen einen signifikant höheren Anteil an nicht-innervierten NMJs im Vergleich zu den anderen Gruppen und insbesondere zu den Gruppen 9 und 10, die eine vollständige Reinnervation (d. h. Fehlen von nicht-innervierten NMJs) erreichen konnten.

Schließlich wurde bei der Gegenüberstellung der Daten der VBMA und der Reinnervation eine schwache negative Korrelation zwischen der Amplitude und dem Anteil nicht-innervierter NMJs festgestellt. Die lineare Regression bestätigte dies, indem sie für jeden Anstieg der nicht-innervierten NMJs um 1 % eine durchschnittliche Abnahme der Amplitude um 0,25° am 56. postoperativen Tag sowie eine durchschnittliche Abnahme der Amplitudendifferenz um 0,58° vorhersagte.

## **5.1. Rolle der neurotrophen Faktoren für die Reinnervation und Funktionswiederherstellung der Vibrissen**

### **5.1.1. BDNF**

Unseren Auswertungen zufolge führte die frühe Neutralisierung von BDNF mit anti-BDNF (Tag 1–13) sowohl in niedriger Dosierung als alleiniges Präparat (Gruppe 6) als auch in hoher Dosierung in Kombination mit durchgehend verabreichtem hochdosiertem FGF-2 (Gruppe 9) zu einer Verbesserung der Vibrissenfunktion, gekennzeichnet durch den Anstieg der Amplitude am 56. Tag sowie durch eine signifikante Amplitudendifferenz. Allerdings schienen diese Therapiemöglichkeiten keinen Effekt auf die Polyinnervation der NMJs zu haben, deren Auftreten nicht signifikant abnahm. Im Gegensatz dazu führte eine späte Verabreichung niedrigdosierten BDNFs (Tag 14–28) entweder als alleiniges Präparat (Gruppe 2) oder in Kombination mit niedrigdosiertem, frühem FGF-2 (Gruppe 8) zu einer signifikanten Abnahme der Polyinnervation bei allerdings fehlender funktioneller Verbesserung der Vibrissenfunktion.

Die frühe Neutralisierung von BDNF hatte keinen signifikanten Einfluss auf die – auch bei der Placebogruppe geringe – Anzahl nicht-innervierter NMJs und keinen signifikanten Einfluss auf die Polyinnervation dieser; dies ließ sich in allen Gruppen, die anti-BDNF erhielten, beobachten (Gruppen 4, 5, 6 und 9). In diesen Gruppen kam es jedoch nur bedingt zu einer funktionellen Besserung der Vibrissenfunktion: Während sich in den Gruppen 6 und 9 eine signifikante Amplitudenerhöhung am 56. Tag feststellen ließ, war das bei den Gruppen 4 und 5 nicht der Fall. In letzteren zwei Gruppen wurde die frühe Behandlung mit anti-BDNF mit einer anschließenden Behandlung mit mittel- oder hochdosiertem BDNF kombiniert. Eine solche späte BDNF-Zugabe könnte dementsprechend dem positiven Effekt der initialen Neutralisierung auf die Vibrissenfunktion entgegenwirken.

Eine späte Verabreichung (Tag 14–28) von niedrigdosiertem BDNF entweder als alleinige Substanz (Gruppe 2) oder in Kombination mit frühem niedrigdosiertem FGF-2 (Gruppe 8) führte zu einem signifikant geringeren Anteil an polyinnervierten NMJs im Vergleich zu der Placebogruppe. Dabei ließ sich jedoch beobachten, dass in diesen Gruppen der Anteil nicht-innervierter NMJs gleichzeitig stieg. Dies könnte einen Erklärungsansatz bieten, warum bei diesen Gruppen mit signifikant geringerer Polyinnervation keine signifikante Besserung der Vibrissenfunktion festgestellt werden konnte. Die Reinnervation scheint hier weniger ausgeprägt zu sein. Die späte Gabe moderater und hoher BDNF-Dosierungen als alleinige Substanz oder in Kombination mit frühem anti-BDNF (Gruppen 3, 4 und 5) zeigte dagegen keinen signifikanten Unterschied zu der Placebogruppe bezüglich der Poly- und Nicht-Innervation von NMJs.

Zusammenfassend lassen sich aus den obigen Beobachtungen zwei Schlüsse ziehen. Erstens scheint die frühe Neutralisierung von BDNF entweder als alleinige Therapiemöglichkeit oder

in Kombination mit hochdosiertem, durchgehend verabreichtem FGF-2 einen positiven Einfluss auf die Amplitude bei gleichbleibender Polyinnervation zu haben. Zweitens scheint die Dosierung einer späten BDNF-Gabe für das Reinnervationsmuster von Bedeutung zu sein. Dabei führen niedrige Dosierungen zu einer signifikanten Abnahme der Polyinnervation – im Vergleich zu der Placebogruppe – bei allerdings steigendem Anteil an nicht-innervierten NMJs sowie fehlender Besserung der Vibrissenfunktion.

### 5.1.2. FGF-2

Die durchgehende Gabe (Tag 1–28) von hochdosiertem FGF-2 als alleinige Therapiemöglichkeit (Gruppe 10) oder in Kombination mit frühem (Tag 1–13) anti-BDNF (Gruppe 9) führte zu einer signifikanten Amplitudenerhöhung am 56. Tag sowie einer signifikanten Amplitudendifferenz, ohne jedoch einen signifikanten Einfluss auf die Polyinnervation im Vergleich zu der Placebogruppe zu haben. Dabei fällt außerdem auf, dass in diesen Gruppen keine nicht-innervierten NMJs nachgewiesen werden konnten, was dem intakten Zustand entspricht.

Niedrigdosiertes FGF-2 entweder als alleinige Substanz durchgehend verabreicht (Gruppe 7) oder in der frühen Phase (Tag 1–13) in Kombination mit spätem niedrigdosiertem BDNF gegeben (Gruppe 8), scheint dagegen zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl an polyinnervierten NMJs zu führen, ohne allerdings einen Einfluss auf die funktionelle Vibrissenfunktion auszuüben. In letzteren beiden Gruppen ist – im Gegensatz zu den ersteren zwei – auffällig, dass die Anzahl an nicht-innervierten NMJs steigt. Auch hier scheint die Reinnervation insgesamt weniger ausgeprägt zu sein.

Abschließend lässt sich aus diesen Beobachtungen entnehmen, dass die *verabreichte Dosis* von FGF-2 eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Die durchgehende Therapie mit *hochdosiertem* FGF-2 (alleinig oder in Kombination mit anti-BDNF) führt zu einer vollständigen Reinnervation und zu einem signifikanten Amplitudenanstieg, ohne jedoch einen signifikanten Einfluss auf die Polyinnervation zu haben. Im Gegensatz dazu kommt es bei einer Behandlung mit *niedrigdosiertem* FGF-2 zu einer signifikanten Abnahme der Polyinnervation bei jedoch gleichzeitiger steigender Anzahl an nicht-innervierten NMJs sowie fehlender funktionellen Besserung der Vibrissenfunktion.

## 5.2. Rolle des Reinnervationsmusters an mangelhafter Funktionswiederherstellung der Vibrissen

Ein fehlerhaftes Reinnervationsmuster nach einer Nervendurchtrennung wird seit Längerem als einer der entscheidenden limitierenden Faktoren für eine zufriedenstellende Funktionswiederherstellung der Target-Muskulatur betrachtet.<sup>16,49</sup> Wie im Abschnitt 2.7 bereits beschrieben, können Fehler bei der Reinnervation sowohl am Läsionsort als auch im Bereich der NMJs vorkommen. Einerseits können die regenerierenden Axone am Läsionsort in die falsche Endoneuralscheide hineinwachsen und damit das falsche Zielgewebe reinnervieren.<sup>80</sup> Dies wird auch durch das sogenannte *kollaterale axonale Branching* begünstigt: Dieser Begriff beschreibt das Phänomen, bei dem aus jedem Axon mehrere Kollateralen entspringen.<sup>15,81,82</sup> Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass aus dem gleichen Axon stammende Kollateralen in mehrere Endoneuralscheiden wachsen und somit anderes Zielgewebe als das Ursprüngliche erreichen. Dieses Phänomen war kein Untersuchungsobjekt des vorliegenden Experiments. Andererseits kommt es auch zu der Polyinnervation der NMJs, bei der eine NMJ aus mehr als einem terminalen Ast reinnerviert wird (s. Abschnitt 2.7).<sup>88</sup>

Mehrere Studien konnten zeigen, dass verschiedene Methoden, die zu einer Abnahme der Polyinnervation führten, mit einer besseren Funktionswiederherstellung der Vibrissen assoziiert waren. GROSHEVA ET AL. (2008) zeigten beispielsweise, dass die Stabilisierung von Mikrotubuli durch lokal appliziertes Taxol zu einer Abnahme der Polyinnervation der NMJs bei gleichzeitiger funktioneller Besserung führte.<sup>90</sup> Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch mehrere Studien, die manuelle Stimulation der denervierten Muskulatur als therapeutische Möglichkeit nutzten.<sup>137–139</sup>

Einzelne Studien der letzten drei Jahrzehnte – darunter auch die vorliegende Arbeit – deuten jedoch darauf hin, dass das Reinnervationsmuster möglicherweise einen geringeren Einfluss auf das funktionelle Ergebnis ausübt, als ihm bisher zugeschrieben wurde.

Zunächst stellten TOMOV ET AL. (2002) fest, dass die blinden *SD/RCS*-Ratten eine perfekte Wiederherstellung der Vibrissenfunktion erreichten, obwohl sich die Genauigkeit der Reinnervation der Muskulatur und das ausgeprägte axonale Branching nicht signifikant von den normalsichtigen Ratten unterschied. Sie schrieben die gute Funktionswiederherstellung der großen Plastizität der fazialen Motoneuronen zu, die durch die – für das Überleben in der Natur notwendige – zwangsläufige Überbeanspruchung der Vibrissen bei den blinden Ratten bedingt war.<sup>131</sup>

GUNTINAS-LICHIUS ET AL. (2005) beobachteten darüber hinaus, dass das axonale Branching nicht die entscheidende Rolle für eine gute Funktionswiederherstellung zu spielen scheint. Eine Reduktion des kollateralen axonalen Branching führte dementsprechend laut den Ergebnissen der Bewegungsanalyse zu keiner signifikant besseren Vibrissenfunktion.<sup>74</sup> MACKINNON

ET AL. (1991) haben – dazu passend – gezeigt, dass sich die Anzahl der Nervenfasern distal der Läsion 24 Monate nach der Nervendurchtrennung wieder normalisiert. Das spricht dafür, dass Kollateralen, die kein angemessenes Ziel erreicht haben, im Verlauf eliminiert werden.<sup>81</sup> Dies unterstützt ebenfalls die Hypothese, dass die Aussprossung von Axonkollateralen nicht der führende Grund für eine unzureichende Funktionswiederherstellung ist.

Obwohl GUNTINAS-LICHIUS ET AL. (2005) herausfanden, dass der Anteil polyinnervierter NMJs bei den blinden deutlich niedriger als bei den normalsichtigen Ratten war, konnte der Schluss, dass hieraus die Unterschiede in der Funktionswiederherstellung resultierten, nicht durch das vorliegende Experiment bestätigt werden.<sup>74</sup> Denn bei den Gruppen, die eine signifikante Amplitudenerhöhung am 56. Tag oder eine signifikante Amplitudendifferenz aufwiesen (Gruppen 3, 6, 9 und 10), konnte keine signifikant geringere Polyinnervation der NMJs im Vergleich zu der Placebogruppe festgestellt werden. Das könnte daher dagegensprechen, dass die NMJ-Polyinnervation einer der entscheidenden Einflussfaktoren auf die erfolgreiche Funktionswiederherstellung ist. Auffällig war jedoch bei all diesen Gruppen, dass sie einen sehr niedrigen Anteil an nicht-innervierten NMJs aufwiesen; in den Gruppen 9 und 10 war die Reinnervation sogar vollständig. Umgekehrt könnte eine Besserung der Vibrissenfunktion in den Gruppen 2, 7 und 8, die einen signifikant geringeren Anteil polyinnervierter NMJs aufwiesen, möglicherweise durch den gleichzeitigen deutlichen Anstieg des Anteils nicht-innervierter NMJs ausgeblieben sein. Dies würde somit einen Hinweis auf die Bedeutung einer erfolgreichen Reinnervation – unabhängig von ihrem Muster – bieten. Diese These wird wiederum auch von dem Vorhersagemodell der linearen Regression unterstützt, das eine Abnahme der Amplitude bei steigendem Anteil nicht-innervierter NMJs vorhersagte (s. Abschnitt 4.3).

Zusammenfassend lässt sich anhand der oben aufgeführten Studienergebnisse spekulieren, dass das Reinnervationsmuster möglicherweise eine geringere Rolle spielt, als bisher vermutet. Künftige Experimente könnten mehr Einblicke in diesen Bereich geben.

### **5.3. Limitationen der Studie**

Eine Limitation der vorliegenden Studie stellt der Untersuchungszeitraum dar. MACKINNON ET AL. (1991) zeigten in einem Experiment mit Ratten, dass es circa zwei Jahre dauert, bis sich die initiale Erhöhung der Nervenfasernzahl wieder normalisiert.<sup>81</sup> Somit können die – aus einer Applikationsdauer der NFs von 28 Tagen und einer insgesamten Beobachtungsdauer von 56 Tagen – gewonnenen Ergebnisse nur begrenzt eine Aussage über die langfristige therapeutische Wirkung von NFs machen.

Darüber hinaus bestand jede Gruppe aus lediglich sechs Ratten. Eine höhere Anzahl von Tieren pro Gruppe würde zu belastbareren Ergebnissen führen.

Für zukünftige Arbeiten mit Bewegungsanalyse sollte außerdem eine Videokamera mit höherer Auflösung verwendet werden, so dass die Vibrissen noch genauer dargestellt werden können. Dies würde zu geringeren – bei schlechter Auflösung unvermeidbaren – Messfehlern führen. Auch die VBMA-Software sollte auf dem neuesten Stand aktualisiert werden, sodass die Kompatibilität mit höher auflösenden Videokameras gewährleistet bleibt.

Es wäre zudem möglich, dass die verabreichten NFs aus folgenden Gründen keine ausreichende Wirkung entfalteten. Zunächst könnten die – von PeproTech hergestellten – verwendeten Substanzen nicht funktionsfähig sein. Dies halten wir jedoch für unwahrscheinlich, da ein früheres Experiment mit von PeproTech hergestellten NFs (BDNF, FGF-2) eine *in vivo* und/oder *in vitro* Axonregeneration zeigte.<sup>126</sup> Zweitens könnten die NFs möglicherweise schneller metabolisiert werden als die Injektionen gegeben wurden; dies könnte auch durch ihre kurze Halbwertszeit erklärt werden. Aus diesem Grund führten wir die Injektionen im 24-Stunden Intervall durch; ein kleineres Intervall zwischen den Injektionen war aus ethischen Gründen nicht vertretbar. Da jedoch eine Messung der Restmenge an NFs, die im Bereich der Schnurrmuskulatur blieb, nicht möglich war, können wir nicht gewährleisten, dass die täglichen Injektionen die optimalen Konzentrationen lieferten. Drittens müsste die verabreichte Dosis der NFs möglicherweise angepasst werden. Da dieses Experiment das erste Mal darstellt, bei dem NFs in die denervierten Muskeln gespritzt wurden, orientierten wir uns an der von PeproTech und SANTOS ET AL. (2016) vorgeschlagenen niedrigsten Dosierung und untersuchten zusätzlich den Effekt höherer Dosierungen.<sup>126</sup> Die optimalen Dosierungen und Zeitabstände zwischen Applikationen sollten jedoch in zukünftigen Studien genauer untersucht werden.

#### **5.4. Fazit und Zukunftsaussichten**

Unter Berücksichtigung unserer Beobachtungen lässt sich darauf schließen, dass die intramuskuläre Applikation bestimmter Kombinationen und Dosierungen von neurotrophen Faktoren zu gewissen Zeitpunkten die Wiederherstellung der Vibrissenfunktion fördern kann, ohne jedoch Einfluss auf den Anteil der Polyinnervation im Reinnervationsmuster der NMJs zu haben.

Dies ist unseren Ergebnissen zufolge der Fall bei der frühen Neutralisierung von BDNF (mittels anti-BDNF) und der durchgehenden Gabe (28 Tage lang) von hochdosiertem FGF-2, entweder einzeln oder miteinander kombiniert. Hochdosiertes FGF-2 (mit oder ohne anti-BDNF) scheint außerdem in der Lage zu sein, eine vollständige Innervation wiederherzustellen.

Bei der Gabe von niedrigdosiertem BDNF und FGF-2 – entweder einzeln oder in Kombination miteinander – kam es dagegen zu einer signifikanten Abnahme des Anteils polyinnervierter

NMJs bei allerdings gleichzeitigem Anstieg der nicht-innervierten NMJs sowie fehlender Besserung der Vibrissenfunktion. Die ausgebliebene Besserung der Vibrissenfunktion könnte durch den erhöhten Anteil nicht-innervierter NMJs erklärt werden und würde die Rolle einer erfolgreichen Reinnervation betonen.

Zukünftige Studien sind daher notwendig, um – bei bisherigem uneindeutigem Forschungsstand – den Einfluss des Reinnervationsmusters auf die Vibrissenfunktion genauer zu untersuchen. Es wäre ebenfalls erforderlich, nach weiteren, bisher unerkannten Ursachen einer mangelhaften postläsionalen Funktionswiederherstellung zu suchen. Die intramuskuläre Verabreichung neurotropher Faktoren bietet eine neue, vielversprechende Therapiemöglichkeit, die die Funktionswiederherstellung fördern könnte. Über die genauen Dosierungen, Kombinationen und Zeitpunkte der Gabe von neurotrophen Faktoren sollte daher ebenfalls geforscht werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Prometheus Kopf, Hals und Neuroanatomie. LernAtlas der Anatomie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2015.
- 2 Geißler K, Urban E, Volk GF, Klingner CM, Witte OW, Guntinas-Lichius O. Non-idiopathic peripheral facial palsy: prognostic factors for outcome. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2021; **278**: 3227–35. <https://doi.org/10.1007/s00405-020-06398-6>.
- 3 Peitersen E. Bell's Palsy: The Spontaneous Course of 2,500 Peripheral Facial Nerve Palsies of Different Etiologies. *Acta Oto-Laryngologica* 2002; **122**: 4–30. <https://doi.org/10.1080/000164802760370736>.
- 4 Bergeron CM, Moe KS. The evaluation and treatment of upper eyelid paralysis. *Facial Plast Surg* 2008; **24**: 220–30. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1075838>.
- 5 Movérare T, Lohmander A, Hultcrantz M, Sjögren L. Peripheral facial palsy: Speech, communication and oral motor function. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* 2017; **134**: 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2015.12.002>.
- 6 Swart BJM de, Verheij JC GE, Beurskens CHG. Problems with eating and drinking in patients with unilateral peripheral facial paralysis. *Dysphagia* 2003; **18**: 267–73. <https://doi.org/10.1007/s00455-003-0011-0>.
- 7 Coulson SE, O'Dwyer NJ, Adams RD, Croxson GR. Expression of emotion and quality of life after facial nerve paralysis. *Otol Neurotol* 2004; **25**: 1014–19. <https://doi.org/10.1097/00129492-200411000-00026>.
- 8 Ishii LE, Godoy A, Encarnacion CO, Byrne PJ, Boahene KDO, Ishii M. What faces reveal: impaired affect display in facial paralysis. *Laryngoscope* 2011; **121**: 1138–43. <https://doi.org/10.1002/lary.21764>.
- 9 Ishii L, Godoy A, Encarnacion CO, Byrne PJ, Boahene KDO, Ishii M. Not just another face in the crowd: society's perceptions of facial paralysis. *Laryngoscope* 2012; **122**: 533–38. <https://doi.org/10.1002/lary.22481>.
- 10 Celik M, Forta H, Vural C. The development of synkinesis after facial nerve paralysis. *Eur Neurol* 2000; **43**: 147–51. <https://doi.org/10.1159/000008154>.
- 11 Yamamoto E, Nishimura H, Hirono Y. Occurrence of sequelae in Bell's palsy. *Acta Otolaryngol Suppl* 1988; **446**: 93–96. <https://doi.org/10.3109/00016488709121848>.
- 12 Boahene KDO. Etiology, Epidemiology, and Pathophysiology of Post-Facial Paralysis Synkinesis. In: Azizzadeh B, Nduka C, eds. Management of Post-Facial Paralysis Synkinesis. Elsevier, 2022: 13–17.
- 13 Guntinas-Lichius O, Prengel J, Cohen O, et al. Pathogenesis, diagnosis and therapy of facial synkinesis: A systematic review and clinical practice recommendations by the international head and neck scientific group. *Front Neurol* 2022; **13**: 1019554. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.1019554>.

- 14 Husseman J, Mehta RP. Management of synkinesis. *Facial Plast Surg* 2008; **24**: 242–49. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1075840>.
- 15 Shawe GDH. On the number of branches formed by regenerating nerve-fibres. *Br J Surg* 1955; **42**: 474–88. <https://doi.org/10.1002/bjs.18004217505>.
- 16 Gordon T. Peripheral Nerve Regeneration and Muscle Reinnervation. *Int J Mol Sci* 2020; **21**. <https://doi.org/10.3390/ijms21228652>.
- 17 Haidarliu S, Simony E, Golomb D, Ahissar E. Muscle architecture in the mystacial pad of the rat. *Anat Rec (Hoboken)* 2010; **293**: 1192–206. <https://doi.org/10.1002/ar.21156>.
- 18 Carvell GE, Simons DJ. Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J Neurosci*. 1990; **10**: 2638–48. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-08-02638.1990>.
- 19 Dörfel J. The innervation of the mystacial region of the white mouse: A topographical study. *J Anat* 1985; **142**: 173–84.
- 20 Bosman LWJ, Houweling AR, Owens CB, et al. Anatomical pathways involved in generating and sensing rhythmic whisker movements. *Front Integr Neurosci* 2011; **5**: 53. <https://doi.org/10.3389/fnint.2011.00053>.
- 21 Dörfel J. The musculature of the mystacial vibrissae of the white mouse. *J Anat* 1982; **135**: 147–54.
- 22 Welker WI. Analysis of Sniffing of the Albino Rat. *Behav* 1964; **22**: 223–44. <https://doi.org/10.1163/156853964X00030>.
- 23 Berg RW, Kleinfeld D. Rhythmic whisking by rat: retraction as well as protraction of the vibrissae is under active muscular control. *J Neurophysiol* 2003; **89**: 104–17. <https://doi.org/10.1152/jn.00600.2002>.
- 24 Hill DN, Bermejo R, Zeigler HP, Kleinfeld D. Biomechanics of the vibrissa motor plant in rat: rhythmic whisking consists of triphasic neuromuscular activity. *J Neurosci*. 2008; **28**: 3438–55. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5008-07.2008>.
- 25 Semba K, Egger MD. The facial "motor" nerve of the rat: control of vibrissal movement and examination of motor and sensory components. *J Comp Neurol* 1986; **247**: 144–58. <https://doi.org/10.1002/cne.902470203>.
- 26 Henstrom D, Hadlock T, Lindsay R, et al. The convergence of facial nerve branches providing whisker pad motor supply in rats: implications for facial reanimation study. *Muscle Nerve* 2012; **45**: 692–97. <https://doi.org/10.1002/mus.23232>.
- 27 Yao L-L, Zhang E, Li C-L, et al. Dual Convergence of Facial Nerve Branches Innervating Whisker Pad in Rats. *Curr Med Sci* 2018; **38**: 982–88. <https://doi.org/10.1007/s11596-018-1973-3>.
- 28 Olmstead DN, Mesnard-Hoaglin NA, Batka RJ, Haulcomb MM, Miller WM, Jones KJ. Facial nerve axotomy in mice: a model to study motoneuron response to injury. *J Vis Exp* 2015: e52382. <https://doi.org/10.3791/52382>.

- 29 Moran LB, Graeber MB. The facial nerve axotomy model. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; **44**: 154–78. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2003.11.004>.
- 30 Ross MH, Pawlina W. *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. Philadelphia u. a.: Wolters Kluwer Health, 2016.
- 31 Jessen KR, Mirsky R. The Success and Failure of the Schwann Cell Response to Nerve Injury. *Front Cell Neurosci* 2019; **13**: 33. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00033>.
- 32 Martin MR, Caddy KW, Biscoe TJ. Numbers and diameters of motoneurons and myelinated axons in the facial nucleus and nerve of the albino rat. *J Anat* 1977; **123**: 579–87.
- 33 Felten DL, O'Banion MK, Maida MS. Neurons and Their Properties. In: Felten DL, O'Banion MK, Maida MS, eds. *Netter's Atlas of Neuroscience*. Philadelphia: Elsevier, 2016: 1–42.
- 34 Nishimune H, Shigemoto K. Practical Anatomy of the Neuromuscular Junction in Health and Disease. *Neurol Clin* 2018; **36**: 231–40. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2018.01.009>.
- 35 Muscle Endplate. In: Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U, eds. *Encyclopedia of Neuroscience*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009: 2497.
- 36 Patton BL. Basal lamina and the organization of neuromuscular synapses. *J Neurocytol* 2003; **32**: 883–903. <https://doi.org/10.1023/B:NEUR.0000020630.74955.19>.
- 37 Valdez G. Formation and maturation of neuromuscular junctions. In: Rubenstein J, Rakic P, Chen B, Kwan KY, eds. *Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS*. Comprehensive Developmental Neuroscience. Elsevier, 2020: 157–84.
- 38 Balice-Gordon RJ. Schwann cells: Dynamic roles at the neuromuscular junction. *Current biology : CB* 1996; **6**: 1054–56. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)70662-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)70662-3).
- 39 Griffin JW, Thompson WJ. Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia* 2008; **56**: 1518–31. <https://doi.org/10.1002/glia.20778>.
- 40 Court FA, Gillingwater TH, Melrose S, et al. Identity, developmental restriction and reactivity of extralaminar cells capping mammalian neuromuscular junctions. *J Cell Sci* 2008; **121**: 3901–11. <https://doi.org/10.1242/jcs.031047>.
- 41 Negro S, Pirazzini M, Rigoni M. Models and methods to study Schwann cells. *J Anat* 2022; **241**: 1235–58. <https://doi.org/10.1111/joa.13606>.
- 42 Beirowski B, Babetto E, Golden JP, et al. Metabolic regulator LKB1 is crucial for Schwann cell-mediated axon maintenance. *Nat Neurosci* 2014; **17**: 1351–61. <https://doi.org/10.1038/nn.3809>.
- 43 Viader A, Golden JP, Baloh RH, Schmidt RE, Hunter DA, Milbrandt J. Schwann cell mitochondrial metabolism supports long-term axonal survival and peripheral nerve function. *J Neurosci*. 2011; **31**: 10128–40. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0884-11.2011>.
- 44 Harty BL, Monk KR. Unwrapping the unappreciated: recent progress in Remak Schwann cell biology. *Curr Opin Neurobiol* 2017; **47**: 131–37. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.10.003>.

- 45 Reddy LV, Koirala S, Sugiura Y, Herrera AA, Ko C-P. Glial Cells Maintain Synaptic Structure and Function and Promote Development of the Neuromuscular Junction In Vivo. *Neuron* 2003; **40**: 563–80. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00682-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00682-2).
- 46 Reynolds ML, Woolf CJ. Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *J Neurocytol* 1992; **21**: 50–66. <https://doi.org/10.1007/BF01206897>.
- 47 Jessen KR, Mirsky R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol* 2016; **594**: 3521–31. <https://doi.org/10.1113/JP270874>.
- 48 Parrinello S, Napoli I, Ribeiro S, et al. EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. *Cell* 2010; **143**: 145–55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.039>.
- 49 Jessen KR, Mirsky R, Lloyd AC. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; **7**: a020487. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020487>.
- 50 Gordon T. The Biology, Limits, and Promotion of Peripheral Nerve Regeneration in Rats and Humans. In: Tubbs RS, Rizk E, Shoja MM, Loukas M, Barbaro N, Spinner RJ, eds. *Nerves and Nerve Injuries. Vol 2: Pain, Treatment, Injury, Disease and Future Directions*, vol 2. Elsevier, 2015: 993–1019.
- 51 Seddon HJ. THREE TYPES OF NERVE INJURY. *Brain* 1943; **66**: 237–88. <https://doi.org/10.1093/brain/66.4.237>.
- 52 Gordon T. The Physiology of Neural Injury and Regeneration: The Role of Neurotrophic Factors. *Journal of Communication Disorders* 2010; **43**: 265–73.
- 53 Rotshenker S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J Neuroinflammation* 2011; **8**: 109. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-109>.
- 54 Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neuroscience Research* 1996; **25**: 101–21. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(96\)01042-5](https://doi.org/10.1016/0168-0102(96)01042-5).
- 55 Gomez-Sanchez JA, Pilch KS, van der Lans M, et al. After Nerve Injury, Lineage Tracing Shows That Myelin and Remak Schwann Cells Elongate Extensively and Branch to Form Repair Schwann Cells, Which Shorten Radically on Remyelination. *J. Neurosci.* 2017; **37**: 9086–99. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1453-17.2017>.
- 56 Gomez-Sanchez JA, Carty L, Iruarrizaga-Lejarreta M, et al. Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. *J Cell Biol* 2015; **210**: 153–68. <https://doi.org/10.1083/jcb.201503019>.
- 57 Kang H, Lichtman JW. Motor axon regeneration and muscle reinnervation in young adult and aged animals. *J. Neurosci.* 2013; **33**: 19480–91. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4067-13.2013>.

- 58 Cattin A-L, Burden JJ, van Emmenis L, et al. Macrophage-Induced Blood Vessels Guide Schwann Cell-Mediated Regeneration of Peripheral Nerves. *Cell* 2015; **162**: 1127–39. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.021>.
- 59 Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 1997; **14**: 67–116. <https://doi.org/10.1007/BF02740621>.
- 60 Streppel M, Azzolin N, Dohm S, et al. Focal application of neutralizing antibodies to soluble neurotrophic factors reduces collateral axonal branching after peripheral nerve lesion. *Eur J Neurosci* 2002; **15**: 1327–42. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.01971.x>.
- 61 Cattin A-L, Lloyd AC. The multicellular complexity of peripheral nerve regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 2016; **39**: 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.04.005>.
- 62 Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 2007; **49**: 1015–26. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.09.053>.
- 63 Chen B, Chen Q, Parkinson DB, Dun X-P. Analysis of Schwann Cell Migration and Axon Regeneration Following Nerve Injury in the Sciatic Nerve Bridge. *Front Mol Neurosci* 2019; **12**: 308. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00308>.
- 64 Miledi R, Slater CR. On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section. *J Physiol* 1970; **207**: 507–28. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1970.sp009076>.
- 65 Sugiura Y, Lin W. Neuron-glia interactions: the roles of Schwann cells in neuromuscular synapse formation and function. *Biosci Rep* 2011; **31**: 295–302. <https://doi.org/10.1042/BSR20100107>.
- 66 Nguyen QT, Sanes JR, Lichtman JW. Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat Neurosci* 2002; **5**: 861–67. <https://doi.org/10.1038/nn905>.
- 67 Kang H, Le T, Thompson W. Terminal Schwann cells guide the reinnervation of muscle after nerve injury. *J Neurocytol* 2003; **32**: 975–85. <https://doi.org/10.1023/B:NEUR.0000020636.27222.2d>.
- 68 Son YJ, Thompson WJ. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* 1995; **14**: 125–32. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90246-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90246-5).
- 69 Kang H, Le T, Thompson WJ. Schwann cell guidance of nerve growth between synaptic sites explains changes in the pattern of muscle innervation and remodeling of synaptic sites following peripheral nerve injuries. *J Comp Neurol* 2019; **527**: 1388–400. <https://doi.org/10.1002/cne.24625>.
- 70 Love FM, Son Y-J, Thompson WJ. Activity alters muscle reinnervation and terminal sprouting by reducing the number of Schwann cell pathways that grow to link synaptic sites. *J Neurobiol* 2003; **54**: 566–76. <https://doi.org/10.1002/neu.10191>.

- 71 Son Y-J, Trachtenberg JT, Thompson WJ. Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends in Neurosciences* 1996; **19**: 280–85. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)10032-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)10032-1).
- 72 Love FM, Thompson WJ. Glial Cells Promote Muscle Reinnervation by Responding to Activity-Dependent Postsynaptic Signals. *J. Neurosci.* 1999; **19**: 10390–96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-23-10390.1999>.
- 73 Söhnchen J, Grosheva M, Kiryakova S, et al. Recovery of whisking function after manual stimulation of denervated vibrissal muscles requires brain-derived neurotrophic factor and its receptor tyrosine kinase B. *Neuroscience* 2010; **170**: 372–80. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06.053>.
- 74 Guntinas-Lichius O, Irintchev A, Streppel M, et al. Factors limiting motor recovery after facial nerve transection in the rat: combined structural and functional analyses. *Eur J Neurosci* 2005; **21**: 391–402. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03877.x>.
- 75 Gutmann E, Young JZ. The re-innervation of muscle after various periods of atrophy. *J Anat* 1944; **78**: 15–43.
- 76 Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst* 2003; **8**: 236–50. <https://doi.org/10.1111/j.1085-9489.2003.03029.x>.
- 77 Koliatsos VE, Price DL. Axotomy as an experimental model of neuronal injury and cell death. *Brain Pathol* 1996; **6**: 447–65. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1996.tb00875.x>.
- 78 Snider WD, Elliott JL, Yan Q. Axotomy-induced neuronal death during development. *J Neurobiol.* 1992; **23**: 1231–46. <https://doi.org/10.1002/neu.480230913>.
- 79 Dai C-F, Kanoh N, Li K-Y, Wang Z. Study on facial motoneuronal death after proximal or distal facial nerve transection. *Am J Otol* 2000; **21**: 115–18. [https://doi.org/10.1016/s0196-0709\(00\)80084-8](https://doi.org/10.1016/s0196-0709(00)80084-8).
- 80 Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* 1990; **13**: 43–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.13.030190.000355>.
- 81 Mackinnon SE, Dellon AL, O'Brien JP. Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle Nerve* 1991; **14**: 1116–22. <https://doi.org/10.1002/mus.880141113>.
- 82 Skouras E, Ozsoy U, Sarikcioglu L, Angelov DN. Intrinsic and therapeutic factors determining the recovery of motor function after peripheral nerve transection. *Ann Anat* 2011; **193**: 286–303. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.02.014>.
- 83 Ferguson TA, Smith GM. Conditions Affecting Accuracy of Peripheral Nerve Reinnervation and Functional Recovery. In: So K-F, Xu X-M, eds. *Neural Regeneration*. London u. a.: Elsevier, 2015: 117–28.

- 84 Ide C, Kato S. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res Suppl* 1990; **13**: S157-64. [https://doi.org/10.1016/0921-8696\(90\)90045-5](https://doi.org/10.1016/0921-8696(90)90045-5).
- 85 Kiryakova S, Söhnchen J, Grosheva M, et al. Recovery of whisking function promoted by manual stimulation of the vibrissal muscles after facial nerve injury requires insulin-like growth factor 1 (IGF-1). *Exp Neurol* 2010; **222**: 226–34. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.12.031>.
- 86 Angelov DN, Gunkel A, Stennert E, Neiss WF. Recovery of original nerve supply after hypoglossal-facial anastomosis causes permanent motor hyperinnervation of the whisker-pad muscles in the rat. *J Comp Neurol* 1993; **338**: 214–24. <https://doi.org/10.1002/cne.903380206>.
- 87 Stennert E. Das Autoparalytische Syndrom - ein Leitsymptom der postparetischen Fazialisfunktion. *Arch Otorhinolaryngol* 1982; **236**: 97–114. <https://doi.org/10.1007/BF00464062>.
- 88 Sinis N, Horn F, Genchev B, et al. Electrical stimulation of paralyzed vibrissal muscles reduces endplate reinnervation and does not promote motor recovery after facial nerve repair in rats. *Ann Anat* 2009; **191**: 356–70. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2009.03.004>.
- 89 Rich MM, Lichtman JW. In vivo visualization of pre- and postsynaptic changes during synapse elimination in reinnervated mouse muscle. *J. Neurosci.* 1989; **9**: 1781–805. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-05-01781.1989>.
- 90 Grosheva M, Guntinas-Lichius O, Angelova SK, et al. Local stabilization of microtubule assembly improves recovery of facial nerve function after repair. *Exp Neurol* 2008; **209**: 131–44. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.09.016>.
- 91 Bendella H, Rink S, Grosheva M, Sarikcioglu L, Gordon T, Angelov DN. Putative roles of soluble trophic factors in facial nerve regeneration, target reinnervation, and recovery of vibrissal whisking. *Exp Neurol* 2018; **300**: 100–10. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.029>.
- 92 Fu SY, Gordon T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy. *J. Neurosci.* 1995; **15**: 3876–85. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-05-03876.1995>.
- 93 Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol* 2003; **27**: 277–324. <https://doi.org/10.1385/MN:27:3:277>.
- 94 Gordon T, Tyreman N, Raji MA. The basis for diminished functional recovery after delayed peripheral nerve repair. *J. Neurosci.* 2011; **31**: 5325–34. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6156-10.2011>.

- 95 Fu SY, Gordon T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged denervation. *J. Neurosci.* 1995; **15**: 3886–95. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-05-03886.1995>.
- 96 Røyttä M, Salonen V. Long-term endoneurial changes after nerve transection. *Acta Neuropathol* 1988; **76**: 35–45. <https://doi.org/10.1007/BF00687678>.
- 97 Höke A, Gordon T, Zochodne DW, Sulaiman OAR. A decline in glial cell-line-derived neurotrophic factor expression is associated with impaired regeneration after long-term Schwann cell denervation. *Exp Neurol* 2002; **173**: 77–85. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7826>.
- 98 Kang H, Le T, Mikesch M, Lichtman JW, Thompson WJ. Terminal Schwann cells participate in neuromuscular synapse remodeling during reinnervation following nerve injury. *J. Neurosci.* 2014; **34**: 6323–33. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4673-13.2014>.
- 99 Cuello AC. Trophic Factors. In: Stolerman IP, ed. *Encyclopedia of Psychopharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 1347.
- 100 Skaper SD. Neurotrophic Factors: An Overview. In: Skaper SD, ed. *Neurotrophic Factors. Methods and protocols*. New York: Humana Press, 2018: 1–17.
- 101 Hefti F, Denton TL, Knusel B, Lapchak PA. Neurotrophic Factors: What Are They and What Are They Doing? In: Loughlin SE, Fallon JH, eds. *Neurotrophic factors*. San Diego: Academic Press, 1993: 25–49.
- 102 Bear MF, Connors BW, Paradiso MA, [Hg.] Engel AK. *Neurowissenschaften. Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- 103 Purves D, Snider WD, Voyvodic JT. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature* 1988; **336**: 123–28. <https://doi.org/10.1038/336123a0>.
- 104 Korsching S. The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J. Neurosci.* 1993; **13**: 2739–48. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-07-02739.1993>.
- 105 Barbacid M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 148–55. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80022-0](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80022-0).
- 106 Yamamoto M, Sobue G, Yamamoto K, Terao S, Mitsuma T. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochem Res* 1996; **21**: 929–38. <https://doi.org/10.1007/BF02532343>.
- 107 Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 1990; **5**: 511–26. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90090-3](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90090-3).

- 108 Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J* 1990; **9**: 2459–64. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07423.x>.
- 109 Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol* 1992; **119**: 45–54. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.1.45>.
- 110 Funakoshi H, Frisén J, Barbany G, et al. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol* 1993; **123**: 455–65. <https://doi.org/10.1083/jcb.123.2.455>.
- 111 Kobayashi NR, Bedard AM, Hincke MT, Tetzlaff W. Increased expression of BDNF and trkB mRNA in rat facial motoneurons after axotomy. *Eur J Neurosci* 1996; **8**: 1018–29. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01588.x>.
- 112 Zhang J-Y, Luo X-G, Xian CJ, Liu Z-H, Zhou X-F. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur J Neurosci* 2000; **12**: 4171–80. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2000.01312.x>.
- 113 Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* 1992; **360**: 757–59. <https://doi.org/10.1038/360757a0>.
- 114 Novikov L, Novikova L, Kellerth J-O. Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. *Neuroscience* 1997; **79**: 765–74. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00665-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00665-3).
- 115 Boyd JG, Gordon T. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci* 2002; **15**: 613–26. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.01891.x>.
- 116 Grothe C, Nikkhah G. The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration. *Anat Embryol (Berl)* 2001; **204**: 171–77. <https://doi.org/10.1007/s004290100205>.
- 117 Gonzalez AM, Berry M, Maher PA, Logan A, Baird A. A comprehensive analysis of the distribution of FGF-2 and FGFR1 in the rat brain. *Brain Research* 1995; **701**: 201–26. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01002-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01002-X).
- 118 Grothe C, Meisinger C, Claus P. In vivo expression and localization of the fibroblast growth factor system in the intact and lesioned rat peripheral nerve and spinal ganglia. *J Comp Neurol* 2001; **434**: 342–57. <https://doi.org/10.1002/cne.1181>.

- 119 Gospodarowicz D, Massoglia S, Cheng J, Lui G-M, Böhlen P. Isolation of pituitary fibroblast growth factor by fast protein liquid chromatography (FPLC): partial chemical and biological characterization. *J Cell Physiol* 1985; **122**: 323–32. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041220223>.
- 120 Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L. Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. *Cell Differ* 1986; **19**: 1–17. [https://doi.org/10.1016/0045-6039\(86\)90021-7](https://doi.org/10.1016/0045-6039(86)90021-7).
- 121 Watabe K, Fukuda T, Tanaka J, Toyohara K, Sakai O. Mitogenic effects of platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta, and heparin-binding serum factor for adult mouse Schwann cells. *Journal of Neuroscience Research* 1994; **39**: 525–34. <https://doi.org/10.1002/jnr.490390504>.
- 122 Davis JB, Stroobant P. Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol* 1990; **110**: 1353–60. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.4.1353>.
- 123 Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, Abraham JA, Fiddes JC, Gospodarowicz D. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature* 1987; **325**: 257–59. <https://doi.org/10.1038/325257a0>.
- 124 Morrison RS, Sharma A, Vellis J de, Bradshaw RA. Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**: 7537–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.19.7537>.
- 125 Walicke P, Cowan WM, Ueno N, Baird A, Guillemin R. Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**: 3012–16. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.3012>.
- 126 Santos D, Gonzalez-Perez F, Navarro X, Del Valle J. Dose-Dependent Differential Effect of Neurotrophic Factors on In Vitro and In Vivo Regeneration of Motor and Sensory Neurons. *Neural Plast* 2016; **2016**: 4969523. <https://doi.org/10.1155/2016/4969523>.
- 127 Otto D, Unsicker K, Grothe C. Pharmacological effects of nerve growth factor and fibroblast growth factor applied to the transected sciatic nerve on neuron death in adult rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett* 1987; **83**: 156–60. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90233-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90233-3).
- 128 Fujimoto E, Mizoguchi A, Hanada K, Yajima M, Ide C. Basic fibroblast growth factor promotes extension of regenerating axons of peripheral nerve. In vivo experiments using a Schwann cell basal lamina tube model. *J Neurocytol* 1997; **26**: 511–28. <https://doi.org/10.1023/A:1015410023132>.
- 129 Grothe C, Meisinger C, Hertenstein A, Kurz H, Wewetzer K. Expression of fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor 1 messenger RNAs in spinal ganglia

- and sciatic nerve: regulation after peripheral nerve lesion. *Neuroscience* 1997; **76**: 123–35. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00355-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00355-7).
- 130 Meisinger C, Grothe C. Differential regulation of fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF receptor 1 mRNAs and FGF-2 isoforms in spinal ganglia and sciatic nerve after peripheral nerve lesion. *J Neurochem* 1997; **68**: 1150–58. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68031150.x>.
- 131 Tomov TL, Guntinas-Lichius O, Grosheva M, et al. An example of neural plasticity evoked by putative behavioral demand and early use of vibrissal hairs after facial nerve transection. *Exp Neurol* 2002; **178**: 207–18. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.8040>.
- 132 Grosheva M, Nohroudi K, Schwarz A, et al. Comparison of trophic factors' expression between paralyzed and recovering muscles after facial nerve injury. A quantitative analysis in time course. *Exp Neurol* 2016; **279**: 137–48. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.02.020>.
- 133 Guntinas-Lichius O, Wewetzer K, Tomov TL, et al. Transplantation of olfactory mucosa minimizes axonal branching and promotes the recovery of vibrissae motor performance after facial nerve repair in rats. *J. Neurosci.* 2002; **22**: 7121–31. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-16-07121.2002>.
- 134 Guntinas-Lichius O, Angelov DN, Tomov TL, Dramiga J, Neiss WF, Wewetzer K. Transplantation of olfactory ensheathing cells stimulates the collateral sprouting from axotomized adult rat facial motoneurons. *Exp Neurol* 2001; **172**: 70–80. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7774>.
- 135 Gundersen HJ. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *Journal of Microscopy* 1986; **143**: 3–45. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1986.tb02764.x>.
- 136 R Core Team 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/> (accessed May 16, 2023).
- 137 Angelov DN, Ceynowa M, Guntinas-Lichius O, et al. Mechanical stimulation of paralyzed vibrissal muscles following facial nerve injury in adult rat promotes full recovery of whisking. *Neurobiol Dis* 2007; **26**: 229–42. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.12.016>.
- 138 Guntinas-Lichius O, Hundeshagen G, Paling T, et al. Manual stimulation of facial muscles improves functional recovery after hypoglossal-facial anastomosis and interpositional nerve grafting of the facial nerve in adult rats. *Neurobiol Dis* 2007; **28**: 101–12. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.07.006>.

139 Bischoff A, Grosheva M, Irintchev A, et al. Manual stimulation of the orbicularis oculi muscle improves eyelid closure after facial nerve injury in adult rats. *Muscle Nerve* 2009; **39**: 197–205. <https://doi.org/10.1002/mus.21126>.

## 7. Anhang

### 7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
<b>Abbildung 1</b>	Schematische Darstellung der Organisation der Vibrissen in der Schnurrhaarregion der Ratte. Die Vibrissen sind in fünf waagerechten (A–E) Reihen und einer sich kaudal davon befindlichen senkrechten ( $\alpha$ – $\delta$ ) Reihe angeordnet. Abgebildet wird außerdem der Verlauf des extrinsischen <i>Musculus nasolabialis</i> , der in dieser Studie behandelt wird. In Anlehnung an BOSMAN ET AL. (2011).	16
<b>Abbildung 2</b>	Schematische Darstellung der Innervation der Schnurrhaarregion durch Äste des <i>Nervus (N.) facialis</i> bei der Ratte. Der <i>N. facialis</i> verlässt das Schläfenbein durch das <i>Foramen stylomastoideum</i> und verzweigt sich anschließend in mehrere Äste. <b>A</b> , <i>Ramus (R) auricularis posterior</i> ; <b>B</b> , <i>R. temporalis</i> ; <b>C</b> , <i>R. zygomaticus</i> ; <b>D</b> , <i>R. buccalis</i> ; <b>E</b> , <i>R. marginalis mandibulae</i> ; <b>F</b> , <i>Rami cervicales</i> ; <b>G</b> , <i>R. stylohyoideus</i> ; <b>H</b> , <i>R. digastricus posterior</i> . Abgebildet ist außerdem der distale <i>Pes</i> , der durch die Verschmelzung des <i>R. buccalis</i> und <i>R. marginalis mandibulae</i> entsteht, sowie die drei Zweige, die aus diesem entspringen (durch die Einrahmung hervorgehoben). In Anlehnung an HENSTROM ET AL. (2012).	18
<b>Abbildung 3</b>	Vereinfachte schematische Darstellung des Aufbaus eines Faszikels, der von Perineurium umhüllt wird. <b>A</b> , Axon; <b>R</b> , Remak-Schwann-Zelle; <b>BG</b> , Blutgefäß; <b>FB</b> Fibroblast; <b>M</b> , Makrophage; <b>m</b> , Mastzelle. In Anlehnung an JESSEN ET AL. (2019).	19
<b>Abbildung 4</b>	Vereinfachte schematische Darstellung der neuromuskulären Endplatte. Diese besteht aus vier Zelltypen: das Neuron bzw. dessen Axonterminal, die Muskelfaser bzw. deren Endplatte, die terminalen Schwann-Zellen (tSC) sowie die Kranozyten. Zwischen dem Axonterminal und der Endplatte befindet sich der synaptische Spalt, der mit extrazellulärer Matrix – organisiert in einer Basallamina – gefüllt ist. Die Acetylcholinrezeptoren auf der postsynaptischen Membran werden durch das (von dem Axonterminal freigesetzte) Acetylcholin aktiviert, was die anschließende Kontraktion der Muskelzelle zur Folge hat. In Anlehnung an COURT ET AL. (2008) und VALDEZ (2020).	21

<p><b>Abbildung 5</b></p>	<p>Vereinfachte schematische Darstellung der postläsionalen Abläufe im Bereich der neuromuskulären Endplatten (NMJs). Im Bild <b>A</b> wird der physiologische Zustand dargestellt: Drei terminale Äste (blau) innervieren drei Muskelfasern (rot). Dabei stammen der linke und mittlere terminale Ast aus dem gleichen Motoneuron, das sich in der Nähe des Muskels verzweigt. Der Kontakt zwischen Axon und Muskelfaser erfolgt im Bereich der NMJ, die von den terminalen Schwann-Zellen (tSCs; grün) kappenförmig bedeckt ist. Das rote Kreuz im Bild <b>B</b> stellt die Nervendurchtrennung dar. Im Anschluss an diese kommt es im distalen Stumpf zu der Waller-Degeneration, bei der die Axone degenerieren und in Fragmente gespalten werden. Die tSCs fangen außerdem damit an, lange Fortsätze zu bilden, um Kontakt zu benachbarten NMJs aufzunehmen. Im Verlauf bilden die jeweiligen tSC-Fortsätze eine Verbindung miteinander, die sogenannte SC-Brücke, die durch den violetten Pfeil im Bild <b>C</b> hervorgehoben wird. Eine solche Brücke entsteht vorzugsweise zwischen einer reinnervierten und einer noch denervierten NMJ. Die regenerierenden Axone wachsen innerhalb der Endoneuralscheide (die einzelnen Endoneuralscheiden werden hier nicht abgebildet) und kommen schließlich im Bereich der NMJs an. Aus verschiedenen Gründen (s. Text) erreichen die Axone zu unterschiedlichen Zeitpunkten die NMJs, sodass gleichzeitig reinnervierte und noch denervierte NMJs vorhanden sind (Bild <b>C</b>). Die Axone, die früher die NMJs erreichen, überschreiten oft die NMJ-Grenzen und wachsen entlang der bereits gebildeten tSC-Fortsätze, um benachbarte NMJs zu reinnervieren. Solche Axone werden als <i>escaped fibers</i> bezeichnet. Der orangene Pfeil im Bild <b>D</b> zeigt eine solche <i>escaped fiber</i>, die die bereits gebildete SC-Brücke als Substrat nutzt, um eine benachbarte NMJ zu erreichen. Es ist möglich, dass eine NMJ sowohl durch ein Axon, das innerhalb der Endoneuralscheide wächst, als auch durch eine <i>escaped fiber</i> reinnerviert wird. In diesem Fall wird eine NMJ – wie diejenige auf der mittleren Muskelfaser im Bild <b>E</b> – polyneuronal innerviert. Es kommt auch vor, dass eine <i>escaped fiber</i> nach der Reinnervation einer benachbarten NMJ dem Verlauf der (benachbarten) Endoneuralscheide folgt und in retrograder Richtung und in diesem Beispiel erneut in anterograder Richtung weiterwächst, um eine dritte NMJ zu reinnervieren (Bild <b>F</b>). Somit wird möglicherweise sichergestellt, dass möglichst viele NMJs schnell reinnerviert werden. In Anlehnung an KANG ET AL. (2019) und SON ET AL. (1996).</p>	<p>28</p>
<p><b>Abbildung 6</b></p>	<p>Schematische Darstellung der Buccalis-Buccalis-Anastomose. <b>(A)</b> Physiologischer, präoperativer Zustand. <b>(B)</b> Nach Durchtrennung des <i>Ramus (R.) buccalis</i> erfolgte seine Reanastomosierung (Pfeil). Der <i>R. marginalis mandibulae</i> wurde ebenfalls durchtrennt und sein proximaler Stumpf ligiert, um die Versorgung der Schnurrhaarmuskulatur durch diesen Ast zu verhindern. Verwendung mit Genehmigung von Wiley. © 2020 Wiley Periodicals, Inc.</p>	<p>39</p>
<p><b>Abbildung 7</b></p>	<p>Videobasierte Bewegungsanalyse der Vibrissen während der Protraktion <b>(A)</b> und Retraktion <b>(B)</b>. Die Punkte <b>s</b> und <b>d</b> markieren die beiden medialen Augenwinkel. Die Hilfslinie <b>s-d</b> dient der Bestimmung der senkrecht zu dieser liegenden medial-sagittal Linie <b>Fr-Occ</b>, die durch die Nasenspitze verläuft. Auf der gesunden linken Seite lässt sich – im Gegensatz zu der operierten rechten Seite – ein großer Unterschied zwischen dem Winkel bei Pro- und Retraktion beobachten. Verwendung mit Genehmigung von Wiley. © 2020 Wiley Periodicals, Inc.</p>	<p>42</p>

<p><b>Abbildung 8</b></p>	<p>Beurteilung des Reinnervationsmusters der neuromuskulären Endplatten (NMJs) mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie. Die axonalen Fortsätze werden in Orange-Rot und die NMJs in Grün dargestellt. Das Bild <b>A</b> zeigt zwei NMJs, die von den terminalen Ästen (Pfeile) des gleichen Motoneurons jeweils monoinnerviert werden (Bild aus einer intakten Ratte). Im Gegensatz dazu ist die unten-mittig im Bild <b>B</b> abgebildete NMJ polyinnerviert, da sie durch zwei axonale Fortsätze reinnerviert wird. Einer davon, der aus der benachbarten oben-links liegenden NMJ stammt (Pfeil), gehört zu den sogenannten <i>escaped fibers</i>. Verwendung mit Genehmigung von Wiley. © 2020 Wiley Periodicals, Inc.</p>	<p>45</p>
<p><b>Abbildung 9</b></p>	<p>Durchschnittliche Whisking-Amplitude (in Grad; <i>Amplitude in degrees</i>; <math>\pm</math> Standardabweichung) in den verschiedenen Tiergruppen vor der Buccalis-Buccalis-Anastomose (BBA; <i>Rats before BBA, no treatment</i>) sowie am 28. und 56. postoperativen Tag (<i>28 bzw. 56 days after BBA</i>). Der – im Vergleich zu der Placebogruppe 1 – signifikante Anstieg der Amplitude am 56. Tag in den Gruppen 6, 9 und 10 wird mit einem Asterisk gekennzeichnet (jeweils <math>p &lt; 0,05</math>). BDNF, Brain-derived neurotrophic factor; FGF-2, Fibroblast growth factor 2. Verwendung mit Genehmigung von Wiley. © 2020 Wiley Periodicals, Inc. Färbung der Grafik durch Herrn Prof. Dr. med. Doychin N. Angelov.</p>	<p>53</p>

## 7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
<b>Tabelle 1</b>	Versuchsaufbau mit Übersicht der Tiergruppen, der Substanzkonzentrationen sowie -kombinationen und der Zeitspanne der Injektionen. BBA, Buccalis-Buccalis-Anastomose; PBS, Phosphate-buffered saline; BDNF, Brain-derived neurotrophic factor; FGF-2, Fibroblast growth factor 2.	40
<b>Tabelle 2</b>	Ergebnisse der videobasierten Bewegungsanalyse in intakten Ratten vor der Buccalis-Buccalis-Anastomose (BBA) sowie am 28. Tag nach der BBA in Ratten, die entweder mit Placebo (Gruppe 1) oder mit Kombinationen von neurotrophen Faktoren bzw. deren neutralisierenden Antikörpern behandelt wurden (Gruppen 2–10). PBS, Phosphate-buffered saline; BDNF, Brain-derived neurotrophic factor; FGF-2, Fibroblast growth factor 2. ‚Früh‘ 1–13 Tage nach der BBA; ‚Spät‘ 14–28 Tage nach der BBA sowie ‚Durchgehend‘ 1–28 Tage nach der BBA.	51
<b>Tabelle 3</b>	Ergebnisse der videobasierten Bewegungsanalyse in intakten Ratten vor der Buccalis-Buccalis-Anastomose (BBA) sowie am 56. Tag nach der BBA in Ratten, die entweder mit Placebo (Gruppe 1) oder mit Kombinationen von neurotrophen Faktoren bzw. deren neutralisierenden Antikörpern behandelt wurden (Gruppen 2–10). Die Gruppendurchschnittswerte, die sich signifikant von der Placebogruppe 1 unterscheiden, werden mit einem Asterisk gekennzeichnet (jeweils $p < 0,05$ ). PBS, Phosphate-buffered saline; BDNF, Brain-derived neurotrophic factor; FGF-2, Fibroblast growth factor 2. ‚Früh‘ 1–13 Tage nach der BBA; ‚Spät‘ 14–28 Tage nach der BBA sowie ‚Durchgehend‘ 1–28 Tage nach der BBA.	52
<b>Tabelle 4</b>	Reinnervationsmuster des <i>Musculus nasolabialis</i> in intakten Ratten vor der Buccalis-Buccalis-Anastomose (BBA) sowie am 56. Tag nach der BBA in Ratten, die entweder mit Placebo (Gruppe 1) oder mit Kombinationen von neurotrophen Faktoren bzw. deren neutralisierenden Antikörpern behandelt wurden (Gruppen 2–10). Die Gruppendurchschnittswerte, die sich signifikant von der Placebogruppe 1 unterscheiden, werden mit einem Asterisk gekennzeichnet (jeweils $p < 0,05$ ). PBS, Phosphate-buffered saline; BDNF, Brain-derived neurotrophic factor; FGF-2, Fibroblast growth factor 2. ‚Früh‘ 1–13 Tage nach der BBA; ‚Spät‘ 14–28 Tage nach der BBA sowie ‚Durchgehend‘ 1–28 Tage nach der BBA.	54

## **8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen**

Rink S, Chatziparaskeva C, Elles L, et al. Neutralizing BDNF and FGF2 injection into denervated skeletal muscle improve recovery after nerve repair. *Muscle Nerve* 2020; 62: 404–12. <https://doi.org/10.1002/mus.26991>.